

# PATENT COOPERATION TREATY

EO US  
PCT JP00 02831

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
US Department of Commerce  
United States Patent and Trademark  
Office, PCT  
2011 South Clark Place Room  
CP2/5C24  
Arlington, VA 22202  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
in its capacity as elected Office

Date of mailing: 09 November 2000 (09.11.00)	
International application No.: PCT/JP00/02831	Applicant's or agent's file reference: KRK-103PCT
International filing date: 28 April 2000 (28.04.00)	Priority date: 30 April 1999 (30.04.99)
Applicant MIYATA, Toshio	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:  
06 October 2000 (06.10.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer:</p> <p>J. Zahra</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
--	--



NR

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi  
Kantetsu Tsukuba Building 6F  
1-1-1, Oroshi-machi  
Tsuchiura-shi  
Ibaraki 300-0847  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 04 December 2000 (04.12.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference KRK-103PCT	
International application No. PCT/JP00/02831	International filing date (day/month/year) 28 April 2000 (28.04.00)

1. The following indications appeared on record concerning:		
<input checked="" type="checkbox"/> the applicant	<input checked="" type="checkbox"/> the inventor	<input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative
Name and Address MIYATA, Toshio 4-2-3-101, Higashinaruse Isehara-shi, Kanagawa 259-1117 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
<input type="checkbox"/> the person	<input type="checkbox"/> the name	<input checked="" type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence
Name and Address MIYATA, Toshio 102 Ekuseru Isehara 16-25, Sakuradai 2-chome Isehara-shi, Kanagawa 259-1132 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned	
<input checked="" type="checkbox"/> the international Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740 14 35	Authorized officer Sean Taylor Telephone No. (41-22) 338 63 38
--	--





特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

清水 初志

殿

あて名

〒 300-0847

茨城県土浦市卸町1-1-1

関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所

PCT

国際予備審査報告の送付の通知書

（法施行規則第57条）

〔PCT規則71.1〕

発送日

（日.月.年）

30.01.01

出願人又は代理人  
の書類記号

KRK-103PCT

重要な通知

国際出願番号

PCT/JP00/02831

国際出願日

（日.月.年） 28.04.00

優先日

（日.月.年） 30.04.99

出願人（氏名又は名称）

宮田 敏男

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。
3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。

4. 注 意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第Ⅱ巻を参照すること。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/JP）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



特 許 協 力 条 約

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 KRK-103PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/02831	国際出願日 (日.月.年) 28.04.00	優先日 (日.月.年) 30.04.99
国際特許分類(IPC) Int.Cl <sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/435, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/18, G01N33/53, G01N33/50, A01K67/02		
出願人(氏名又は名称) 宮田 敏男		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。  
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で                      ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  
  - ☒ 国際予備審査報告の基礎
  - ☐ 優先権
  - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
  - ☐ 発明の単一性の欠如
  - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
  - ☐ ある種の引用文献
  - ☐ 国際出願の不備
  - ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 06.10.00	国際予備審査報告を作成した日 17.01.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 北村 弘樹 印	4B 2936
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		



I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- |                                     |   |       |        |                      |
|-------------------------------------|---|-------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 | _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 | _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 | _____ | ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
|                                     |   |       |        |                      |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 | _____ | 項、     | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 | _____ | 項、     | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 | _____ | 項、     | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 | _____ | 項、     | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
|                                     |   |       |        |                      |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 | _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 | _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 | _____ | ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
|                                     |   |       |        |                      |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-20	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-20	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-20	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

- 文献1 : Kidney International, Vol.53, No.1, (1998), YOSHINARI YASUDA, et al.,  
 "Functional quantitative analysis of the genome in clustered human mesangial cells", p.154-158
- 文献2 : J.Clin.Invest., Vol.102, No.4, (1998), Toshio Miyata, et al.,  
 "A Mesangium-predominant Gene, Megsin, Is a New Serpin Upregulated in IgA Nephropathy", p.828-836

請求の範囲 1-20

請求の範囲 1-20 に記載された発明は、文献1及び2より進歩性を有さない。

文献1には、培養ヒトメサングウム細胞からmRNAを抽出し、3'-directed cDNAライブラリーを作成し、クローンに挿入された遺伝子断片のシーケンスとコンピュータ解析を行い、その中からメサングウム細胞特異的高発現の新規遺伝子群をクローニングしたことが記載されている。また、文献2には、文献1に記載された方法によって得られたメサングウム細胞特異的高発現の新規遺伝子群のうちの一つの遺伝子メグシンが記載されている。してみると、文献1に記載された方法を用いて、その他のメサングウム細胞特異的高発現の新規遺伝子をクローニングすることは、当業者が容易になし得ることである。





特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際調査機関）



出願人代理人 清水 初志 股 あて名 〒 300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所		PCT 国際調査報告又は国際調査報告を作成しない旨 の決定の送付の通知書 （法施行規則第41条） （PCT規則44.1）	
		発送日 （日.月.年） 15.08.00	
出願人又は代理人 の書類記号 KRK-103PCT		今後の手続きについては、下記1及び4を参照。	
国際出願番号 PCT/JP00/02831		国際出願日 （日.月.年） 28.04.00	
出願人（氏名又は名称） 宮田 敏男			

1. ☒ 国際調査報告が作成されたこと、及びこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。  
 PCT19条の規定に基づく補正書及び説明書の提出  
 出願人は、国際出願の請求の範囲を補正することができる（PCT規則46参照）。  
 いつ 補正書の提出期間は、通常国際調査報告の送付の日から2月である。  
 詳細については添付用紙の備考を参照すること。  
 どこへ 直接次の場所へ  
 The International Bureau of WIPO  
 34, chemin des Colombettes  
 1211 Geneva 20, Switzerland  
 Facsimile No.: (41-22)740.14.35  
 詳細な手続については、添付用紙の備考を参照すること。

2. ☐ 国際調査報告が作成されないこと、及び法第8条第2項（PCT17条(2)(a)）の規定による国際調査報告を作成しない旨の決定をこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

3. ☐ 法施行規則第44条（PCT規則40.2）に規定する追加手数料の納付に対する異議の申立てに関して、出願人に下記の点を通知する。  
☐ 異議の申立てと当該異議についての決定を、その異議の申し立てと当該異議についての決定の両方を指定官庁へ送付することを求める出願人の請求とともに、国際事務局へ送付した。  
☐ 当該異議についての決定は、まだ行われていない。決定されたい出願人に通知する。

4. 今後の手続： 出願人は次の点に注意すること。  
 優先日から18月経過後、国際出願は国際事務局によりすみやかに国際公開される。出願人が公開の延期を望むときは、国際出願又は優先権の主張の取下げの通知がPCT規則90の2.1及び90の2.3にそれぞれ規定されているように、国際公開の事務的な準備が完了する前に国際事務局に到達しなければならない。  
 出願人が優先日から30月まで（官庁によってはもっと遅く）国内段階の開始を延期することを望むときは、優先日から19月以内に、国際予備審査の請求書が提出されなければならない。  
 国際予備審査の請求書若しくは、後にする選択により優先日から19箇月以内に選択しなかった又は第II章に拘束されないため選択できなかったすべての指定官庁に対しては優先日から20月以内に、国内段階の開始のための所定手続を取らなければならない。

名称及びあて名 日本国特許庁（ISA/JP） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員 特許庁長官 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 2936
--	---	---------



P C T

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号	K R K - 1 0 3 P C T	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 0 0 / 0 2 8 3 1	国際出願日 (日.月.年) 2 8 . 0 4 . 0 0	優先日 (日.月.年) 3 0 . 0 4 . 9 9	
出願人(氏名又は名称) 宮田 敏男			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/435, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/18, G01N33/53, G01N33/50, A01K67/027		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/435, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/18, G01N33/53, G01N33/50, A01K67/027		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq BIOSYS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	YOSHINARI YASUDA, et al., "Functional quantitative analysis of the genome in clustered human mesangial cells", Kidney International(1998), Vol.53, No.1, p.154-158	1-20
Y	Toshio Miyata, et al., "A Mesangium-predominant Gene, Megsin, Is a New Serpin Upregulated in IgA Nephropathy", J. Clin. Invest. (1998), Vol.102, No.4, p.828-836	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 02.08.00	国際調査報告の発送日 15.08.00	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 引地 進 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 2936



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO, 99/33981, A2 (INCYTE PHARMATICALS, INC), 8. 7月. 1999 (08. 07. 99), SEQ ID NO:24 (ファミリーなし)	6, 11
A	EP, 780472, A2 (Hsp Research Institute, Inc.) - 25. 6月. 1997 (25. 06. 97), p. 13-15 SEQ ID NO:2 2945-2959bp &JP, 10-84971, A, p. 11-13 配列番号:2 2945-2959bp &AU, 7423796, A & CN, 1158896, A	6, 11
P, A	寺田典生 外著, 「腎疾患の分子医学 腎臓病とシグナル伝達」, 現代医療, 2000年3月, 第32巻, 第3号, p. 745-750	1-20





## 国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)  
[P C T 1 8 条、P C T 規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号	K R K - 1 0 3 P C T	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0 ) 及び下記 5 を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 0 0 / 0 2 8 3 1	国際出願日 (日.月.年) 2 8 . 0 4 . 0 0	優先日 (日.月.年) 3 0 . 0 4 . 9 9	
出願人 (氏名又は名称) 宮田 敏男			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (P C T 1 8 条) の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (P C T 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## 特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

清水 初志

股

あて名

〒 300-0847

茨城県土浦市卸町1-1-1

関鉄つくばビル6階 清水国際特許事務所

PCT見解書

(法第13条)  
[PCT規則66]発送日  
(日.月.年)

31.10.00

出願人又は代理人  
の書類記号

KRK-103PCT

応答期間

上記発送日から 2 月以内

国際出願番号

PCT/JPO0/02831

国際出願日

(日.月.年) 28.04.00

優先日

(日.月.年) 30.04.99

国際特許分類 (IPC) Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/12, C07K14/435, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/18, G01N33/53, G01N33/50, A01K67/02

出願人 (氏名又は名称)

宮田 敏男

- これは、この国際予備審査機関が作成した 1 回目の見解書である。
- この見解書は、次の内容を含む。
  - ☒ 見解の基礎
  - ☐ 優先権
  - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成
  - ☐ 発明の単一性の欠如
  - ☒ 法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
  - ☐ ある種の引用文献
  - ☐ 国際出願の不備
  - ☐ 国際出願に対する意見
- 出願人は、この見解書に応答することが求められる。  
いつ? 上記応答期間を参照すること。この応答期間に間に合わないときは、出願人は、法第13条 (PCT規則66.2(d)) に規定するとおり、その期間の経過前に国際予備審査機関に期間延長を請求することができる。ただし、期間延長が認められるのは合理的な理由があり、かつスケジュールに余裕がある場合に限られることに注意されたい。  
どのように? 法第13条 (PCT規則66.3) の規定に従い、答弁書及び必要な場合には、補正書を提出する。補正書の様式及び言語については、法施行規則第62条 (PCT規則66.8及び66.9) を参照すること。  
なお 補正書を提出する追加の機会については、法施行規則第61条の2 (PCT規則66.4) を参照すること。補正書及び/又は答弁書の審査官による考慮については、PCT規則66.4の2を参照すること。審査官との非公式の連絡については、PCT規則66.6を参照すること。  
応答がないときは、国際予備審査報告は、この見解書に基づき作成される。
- 国際予備審査報告作成の最終期限は、PCT規則69.2の規定により 30.08.01 である。

名称及びあて先

日本国特許庁 (IPEA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

4B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



## I. 見解の基礎

1. この見解書は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に回答するために提出された差替え用紙は、この見解書において「出願時」とする。)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき見解書を作成した。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この見解書は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第13条(PCT規則66.2(a)(ii)に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	- 1-20	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-20	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-20	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明

文献1: YOSHINARI YASUDA, et al. "Functional quantitative analysis of the genome in clustered human mesangial cells",  
Kidney International (1998), Vol. 53, No. 1, p. 154-158

文献2: Toshio Miyata, et al., "A Mesangium-predominant Gene, Megsin, Is a New Serpin Upregulated in IgA Nephropathy", J. Clin. Invest. (1998),  
Vol. 102, No. 4, p. 828-836

請求の範囲 1-20

請求の範囲 1-20 に記載された発明は、文献1及び2より進歩性を有さない。

文献1には、培養ヒトメサンギウム細胞からmRNAを抽出し、3'-directed cDNAライブラリーを作成し、クローンに挿入された遺伝子断片のシーケンスとコンピュータ解析を行い、その中からメサンギウム細胞特異的高発現の新規遺伝子群をクローニングしたことが記載されている。また、文献2には、文献1に記載された方法によって得られたメサンギウム細胞特異的高発現の新規遺伝子群のうちの一つの遺伝子メグシンが記載されている。してみると、文献1に記載された方法を用いて、その他のメサンギウム細胞特異的高発現の新規遺伝子をクローニングすることは、当業者が容易になし得ることである。





## PATENT COOPERATION TREATY

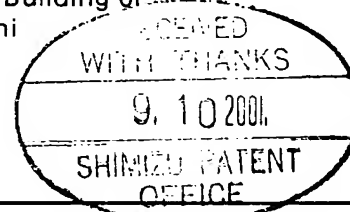
**PCT**  
**NOTIFICATION OF TRANSMITTAL**  
**OF COPIES OF TRANSLATION**  
**OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY**  
**EXAMINATION REPORT**

-(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIMIZU, Hatsushi  
 Kantetsu Tsukuba Building 6F  
 1-1-1, Oroshi-machi  
 Tsuchiura-shi  
 Ibaraki 300-0847  
 JAPON



<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 30 August 2001 (30.08.01)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
<b>Applicant's or agent's file reference</b> KRK-103PCT	
<b>International application No.</b> PCT/JP00/02831	<b>International filing date (day/month/year)</b> 28 April 2000 (28.04.00)
<b>Applicant</b> MIYATA, Toshio et al	

**1. Transmittal of the translation to the applicant.**

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

**2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.**

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP,AT,AU,CA,CH,CN,CZ,FI,NO,NZ,PL,RO,RU,SK,US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

AP,EA,AE,AG,AL,AM,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CR,CU,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU, ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,PT,SD,SE,SG, SI,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW,OA

**3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).**

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer  Elliott PERETTI  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--



27  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

# PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference <b>KRK-103PCT</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. <b>PCT/JP00/02831</b>	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) <b>28 April 2000 (28.04.00)</b>	Priority date ( <i>day/month/year</i> ) <b>30 April 1999 (30.04.99)</b>
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC <b>C12N 15/12, C07K 14/435, C12N 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P 21/02, C07K 16/18, G01N 33/53, 33/50, A01K 67/02</b>		
Applicant <b>MIYATA, Toshio</b>		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.  
  
☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  
  
 These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand <b>06 October 2000 (06.10.00)</b>	Date of completion of this report <b>17 January 2001 (17.01.2001)</b>
Name and mailing address of the IPEA/JP  Facsimile No.	Authorized officer  Telephone No.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/02831

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/02831

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-20	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-20	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-20	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

Document 1: Yoshinari Yasuda, et al., "Functional quantitative analysis of the genome in clustered human mesangial cells," *Kidney International*, Vol. 53, No. 1, 1998, p. 154-158

Document 2: Toshio Miyata, et al., "A mesangial-predominate gene, Megsin, is a new serpin upregulated in IgA nephropathy," *J. Clin. Invest.*, Vol. 102, No. 4, 1998, p. 828-836

Claims 1-20

Based on the descriptions in documents 1 and 2, the inventions set forth in Claims 1-20 do not appear to involve an inventive step.

Document 1 describes the extraction of mRNA from cultured human mesangial cells, the preparation of a 3'-directed cDNA library, performing sequencing and computer analysis of gene fragments inserted into a clone, and cloning a novel gene group that is expressed specifically and in large amounts in mesangial cells. Document 2 describes one gene, Megsin, from the novel gene group that is expressed specifically and in large amounts in mesangial cells that was obtained by the method described in document 1. This being the case, persons skilled in the art can easily perform cloning of other novel genes that are expressed specifically and in large quantities in mesangial cells using the method described in document 1.



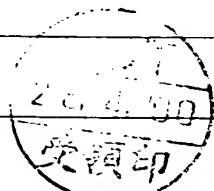




## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2000年04月28日 (28. 04. 2000) 金曜日 10時35分50秒

KRK-103PCT

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号.	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	様式-PCT/R0/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.90 (updated 08.03.2000)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (R0/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	KRK-103PCT
I	発明の名称	メグー3タンパク質
II	出願人	
II-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
II-2	右の指定国についての出願人である。	すべての指定国 (all designated States)
II-4ja	氏名(姓名)	宮田 敏男
II-4en	Name (LAST, First)	MIYATA, Toshio
II-5ja	あて名:	259-1117 日本国 神奈川県 伊勢原市 東成瀬 4-2-3-101
II-5en	Address:	4-2-3-101, Higashinaruse Isehara-shi, Kanagawa 259-1117 Japan
II-6	国籍(国名)	日本国 JP
II-7	住所(国名)	日本国 JP
III-1	その他の出願人又は発明者	
III-1-1	この欄に記載した者は	出願人である (applicant only)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
III-1-4ja	氏名(姓名)	黒川 清
III-1-4en	Name (LAST, First)	KUROKAWA, Kiyoshi
III-1-5ja	あて名:	162-0061 日本国 東京都 新宿区 市谷柳町 49
III-1-5en	Address:	市ヶ谷ヒルズ 401 Ichigayahills 401 49, Ichigaya Yanagi-cho Shinjuku-ku, Tokyo 162-0061 Japan
III-1-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-1-7	住所(国名)	日本国 JP



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

KRK-103PCT

原本 (出願用) - 印刷日時 2000年04月28日 (28. 04. 2000) 金曜日 10時35分50秒

IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja	氏名 (姓名)	清水 初志
IV-1-1en	Name (LAST, First)	SHIMIZU, Hatsushi
IV-1-2ja	あて名:	300-0847 日本国 茨城県 土浦市 卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6階
IV-1-2en	Address:	Kantetsu Tsukuba Bldg. 6F, 1-1-1, Oroshi-machi, Tsuchiura-shi, Ibaraki 300-0847 Japan
IV-1-3	電話番号	0298-41-2001
IV-1-4	ファクシミリ番号	0298-41-2009
IV-2	その他の代理人	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent)
IV-2-1ja	氏名	橋本 一憲
IV-2-1en	Name (s)	HASHIMOTO, Kazunori
V	国の指定	
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AP: GH GM KE LS MW SD SL SZ TZ UG ZW 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国 EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国 EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国 OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML MR NE SN TD TG 及びアフリカ知的所有権 機構と特許協力条約の締約国である他の国
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH&LI CN CR CU CZ DE DK DM DZ EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて、規則4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約のもとで認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、V-6欄に示した国の指定を除く。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。	
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2000年04月28日（28.04.2000）金曜日 10時35分50秒

KRK-103PCT

VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張		
VI-1-1	先の出願日	1999年04月30日 (30.04.1999)	
VI-1-2	先の出願番号	特願平11-123561号	
VI-1-3	国名	日本国 JP	
VI-2	優先権 証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁に対して請求している。	VI-1	
VII-1	特定された国際調査機関(ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII-1	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
VIII-1-1	願書	4	-
VIII-1-2	明細書（配列表を除く）	36	-
VIII-1-3	請求の範囲	2	-
VIII-1-4	要約	1	abst. txt
VIII-1-5	図面	2	-
VIII-1-6	明細書の配列表	19	-
VIII-1-7	合計	64	
VIII-1-8	添付書類	添付	添付された電子データ
VIII-1-8	手数料計算用紙	✓	-
VIII-1-9	別個の記名押印された委任状	✓	-
VIII-1-15	計算機読取可能な媒体によるマルチメディア及び/又はアミノ酸配列リスト		別個のフレキシブルディスク
VIII-1-16	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
VIII-1-17	その他	納付する手数料に相当する納付済証を貼付した書面	-
VIII-1-17	その他	陳述書	-
VIII-1-17	その他	フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面	-
VIII-1-18	要約書とともに提示する図の番号		
VIII-1-19	国際出願の使用言語名:	日本語 (Japanese)	
IX-1	提出者の記名押印		
IX-1-1	氏名(姓名)	清水 初志	
IX-2	提出者の記名押印		
IX-2-1	氏名(姓名)	橋本 一憲	
受理官庁記入欄			
10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日		
10-2	図面:		
10-2-1	受理された		
10-2-2	不足図面がある		



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

KRK-103PCT

原本（出願用） - 印刷日時 2000年04月28日（28. 04. 2000） 金曜日 10時35分50秒

10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

## 国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--





## 腎臓病とシグナル伝達

P.A

寺田典生, 丸茂文昭\*

東京医科歯科大学医学部 第二内科 (\*教授)

## はじめに

増殖性糸球体腎炎は、メサンギウム細胞の増殖とメサンギウム基質の増加を主体とする病変であるが、このような糸球体腎炎の発症、進展には、多くの増殖因子、サイトカイン、血管作動物質が関与しており、それらの細胞内での情報伝達系はメサンギウム細胞の増殖や形質を決める上できわめて重要な働きをしていると考えられる。

メサンギウム細胞や尿細管細胞は各種サイトカインや浸透圧刺激に対して細胞増殖、分化、アポトーシスや各種オスモライトの蓄積などの反応を示す。これらの外的刺激は、まず細胞膜受容体を活性化し、核内に刺激を伝達し、最終的には核内の転写因子へと伝わり、形質の変化をもたらす蛋白の発現をひき起こす。この細胞内情報伝達系として近年急速に解析が進んでいる分子として、MAP キナーゼファミリー、JAK-STAT 系、および cGMP-G-キナーゼがある。MAP キナーゼファミリーは現在までに4種類(ERK, JNK, p38, ERK5)の存在が知られている。MAP キナーゼはセリン/スレオニンキナーゼであり、MAP キナーゼ自身もその上

流にある MAPK キナーゼ(MAPKK, MEK, MKK)によりリン酸化され、活性化され、MAPK ホスファターゼにより不活性化される。MAPK キナーゼ(MAPKK)もその上流のキナーゼである MAPKK キナーゼ(MAPKKK)によりリン酸化される。

本稿では、ほ乳類での一般的な MAP キナーゼファミリーの構成と、最近少しずつ報告が出はじめた腎細胞における MAP キナーゼファミリーの生理あるいは病態での役割について解説し、JAK-STAT 系、cGMP-G-キナーゼ系についても言及したい。

## MAP キナーゼファミリーの

## 構成とその制御

MAP キナーゼファミリーのメンバーは、ほ乳類ではこれまでに4種類が知られている(図1)。すなわち、extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) と p38/MAPKAP kinase-2 reactivating kinase (RK), ERK5 (big mitogen activated kinase: BMK1) である。MAP キナーゼは酵母からヒトまで生物種をこえて存在し、保存され



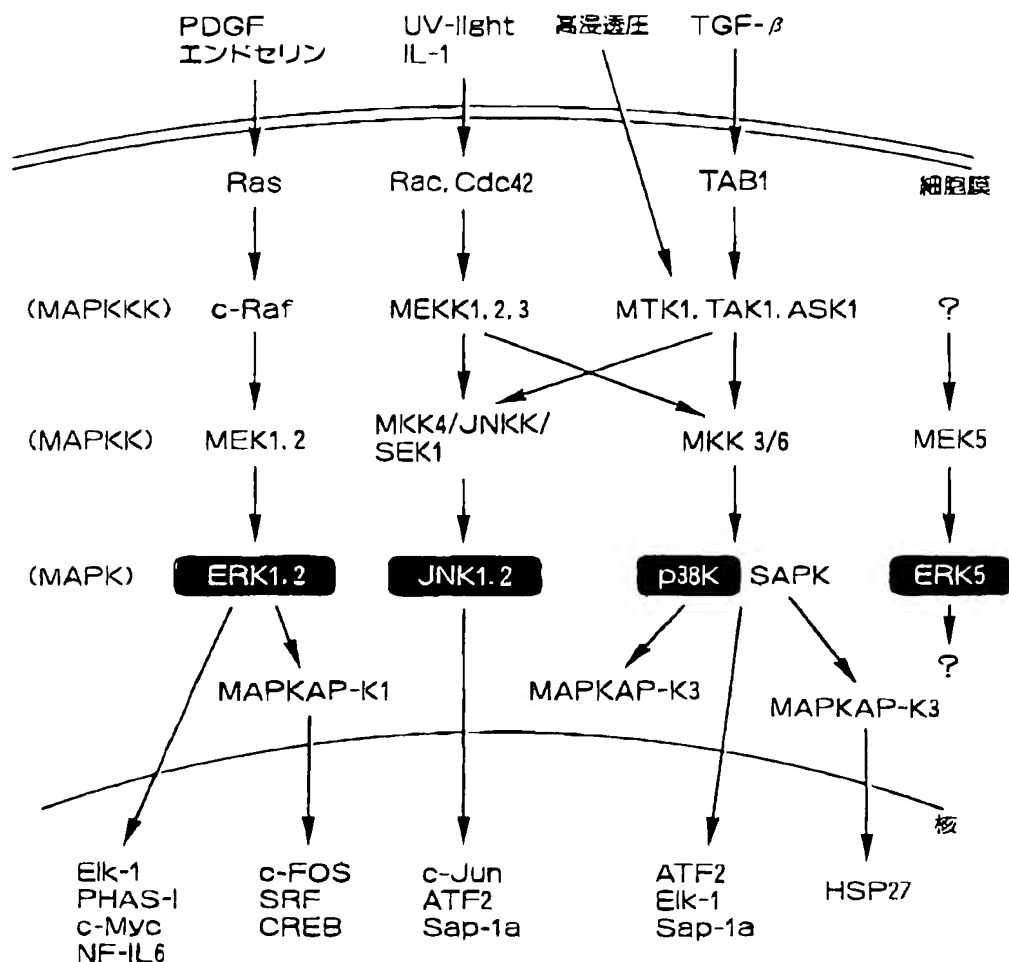
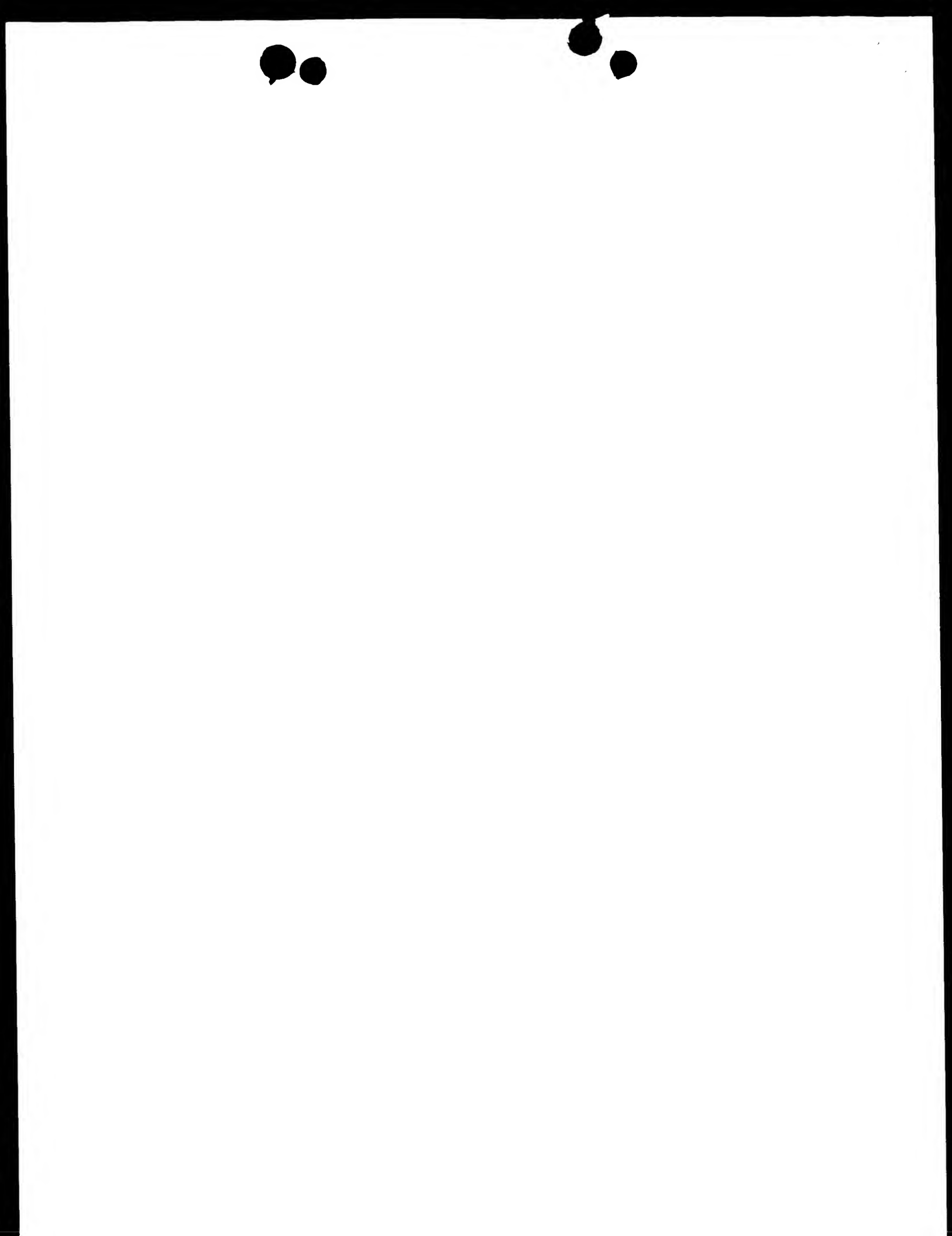


図 1. ほ乳類の MAPK ファミリーのシグナル伝達経路

ており、細胞の機能制御を仲介している。MAP キナーゼカスケードは MAPKKK-MAPKK-MAPK の三段階のリン酸化反応により種々の刺激を核内に伝達する<sup>1)</sup>。

EGF や PDGF などの増殖因子は、チロシンキナーゼ活性を細胞内ドメインに持つ受容体を活性化し、受容体のチロシン残基の自己リン酸化をひき起す。この自己リン酸化のシグナルが GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2) や SOS (son of sevenless, gene product of Drosophila) などのアダプター分子の情報伝達を経て、低分子型 G 蛋白の Ras が GRB2, SOS

の複合体に結合する。Ras は GDP 型から GTP 型へ変換され、活性化される。この活性化の Ras が、MAPKK キナーゼである Raf を活性化し、MAPKK-MAPK にシグナルを伝達する。一方、エンドセリンなどの G 蛋白-結合型受容体の情報も、G 蛋白を介してあるいは受容体型チロシンキナーゼを介して、Ras に伝わり、MAPKK キナーゼである Raf を活性化すると考えられている。したがって、数多くのサイトカイン、血管作動物質、増殖因子などの受容体からのシグナルが収斂し MAP キナーゼファミリーを刺激して核内に情報を伝達すると考えら



れる。MAP キナーゼは増殖刺激などにより、細胞質から核内に移動することが知られている。したがって、細胞質内の蛋白と核内蛋白ともに MAP キナーゼの基質になりうる。

### クラシカル MAP キナーゼ (ERK)

増殖因子により活性化されるクラシカル MAP キナーゼ (ERK) は 42 kDa と 44 kDa の 2 種からなる。クラシカル MAP キナーゼの上流は MEK1 と MEK2 であり、MEK1/2 は ERK に選択性の高い MAPK キナーゼである。MEK1/2 の上流のひとつは前述の Raf-1 であり、増殖因子からのシグナルを MEK1/2 に伝達する。ERK がリン酸化する基質としては、Elk-1, c-Myc, p90RSK などが知られている。Elk-1 は、serum responsive factor とともに、多くの遺伝子の調節領域に存在する serum responsive elements に結合する。

Dunn らのグループは最近、実験腎炎の糸球体において持続的に MEK1 が活性化され、ERK の活性が増強していることを報告しており、ERK の活性化は糸球体腎炎の病態に関与している可能性がある<sup>2)</sup>。また著者らのグループは、MAPK キナーゼファミリーの細胞増殖への調節を細胞周期調整遺伝子の遺伝子発現の面から検討した。活性型の ERK の強制発現によりサイクリン D1 の転写活性と蛋白発現が増強し、細胞周期が G1 期から S 期に移行することを報告している<sup>3)</sup>。

### JNK (c-Jun N-terminal kinase)

JNK は SAPK (stress-activated protein kinase) とも呼ばれ、JNK1 (46 kDa) と JNK2 (55 kDa) の 2 種が同定されている<sup>4)</sup>。JNK は Thr-Pro-Tyr の配列が MAPKK に属する MKK4/SEK1 によってリン酸化されると活性化され、c-Jun の 63 番目と 73 番目のセリンをリン酸化する。MKK4/SEK1 の上流の情報伝達系としては、MEKK1、その上流には、Cdc42、

小分子 G 蛋白の Rac が関与していることが報告されている。基質としては ATF2 (activating transcription factor 2)、c-Jun が知られている。JNK の pathway は、主として紫外線、熱、高浸透圧などのストレスや TNF- $\alpha$ 、lipopolysaccharide (LPS)、IL-1 などによっても活性化される。また EGF や、NGF によっても JNK は部分的に活性化されるが、その場合は Ras 依存性である。メサンギウム細胞においてもエンドセリンが JNK を活性化するという報告がある。

### p38 キナーゼ

p38 キナーゼは、酵母の MAP キナーゼの Hog1 と高いホモロジーをもち、LPS によりリン酸化されるマウス B 細胞由来の蛋白質としてクローニングされた<sup>5)</sup>。p38 キナーゼは Thr-Gly-Tyr の配列が MAPKK に属する MKK3/6 によってリン酸化されると活性化される。MKK3/6 の上流の情報伝達系としては、ASK1 (apoptosis signal regulating kinase 1) と TAK1 (TGF- $\beta$  activating kinase) が報告されている。基質としては ATF2 と CHOP (C/EBP homologous protein) が知られている。著者らのグループは、活性型の TAK1 および p38 キナーゼの強制発現によりサイクリン D1 の転写活性と蛋白発現が減少し、細胞周期の G1 期から S 期が抑制されることを報告している<sup>3)</sup>。

### ERK5 (big mitogen activated kinase, BMK1)

最近、ほ乳類のもう一つの MAPK キナーゼとして、ERK5 がクローニングされた。ERK5 の上流は MEK5 と考えられている。ERK5 は不明な点が多いが、PDGF などの増殖刺激にたいしての活性作用は弱く、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は ERK5 を活性化することから、ERK5 は、redox sensitive な MAPK キナーゼとしての役割が考えられている。



## 腎における MAP キナーゼファミリー の役割

腎における MAP キナーゼファミリーの生理あるいは病態での役割について、いくつか報告されている。著者らは、腎ネフロンセグメントにおける、MAP キナーゼファミリー (Raf-1, MKK1, p42 MAP kinase, p44 MAP kinase) の存在を遺伝子発現を RT-PCR 法で、蛋白の存在を Western blots にて検討し報告した<sup>6)</sup>。その調整は、糸球体においては PDGF とエンドセリンが、近位尿細管ではアンジオテンシン II と IGF-I が、ヘンレの太い上行脚においては EGF が、集合尿細管においてはエンドセリンと EGF が、ERK の活性を上昇させた<sup>6)</sup>。

個々の腎細胞においても検討が進んでいる。

培養メサンギウム細胞においても、PDGF、エンドセリンおよびアンジオテンシン II が ERK カスケードを活性化させることが報告されている。さらに PDGF とエンドセリンは培養メサンギウム細胞において *de novo* の ERK と MEK の合成も刺激する。したがって、ERK カスケードは各種増殖因子のメサンギウム細胞増殖調整の key factor と考えられる。そこで著者らは、ERK カスケードと MKK3/6-p38K カスケードの細胞周期におよぼす影響を検討した。構造的活性型 MKK1 の強制発現により、尿細管細胞およびメサンギウム細胞において、G1/S 移行の重要な key factor であるサイクリン D1 の転写活性と蛋白発現が増強し、細胞周期が G1 期から S 期に移行することを報告している<sup>7)</sup>。一方、構造的活性型の MKK3/6 と p38K はサイ

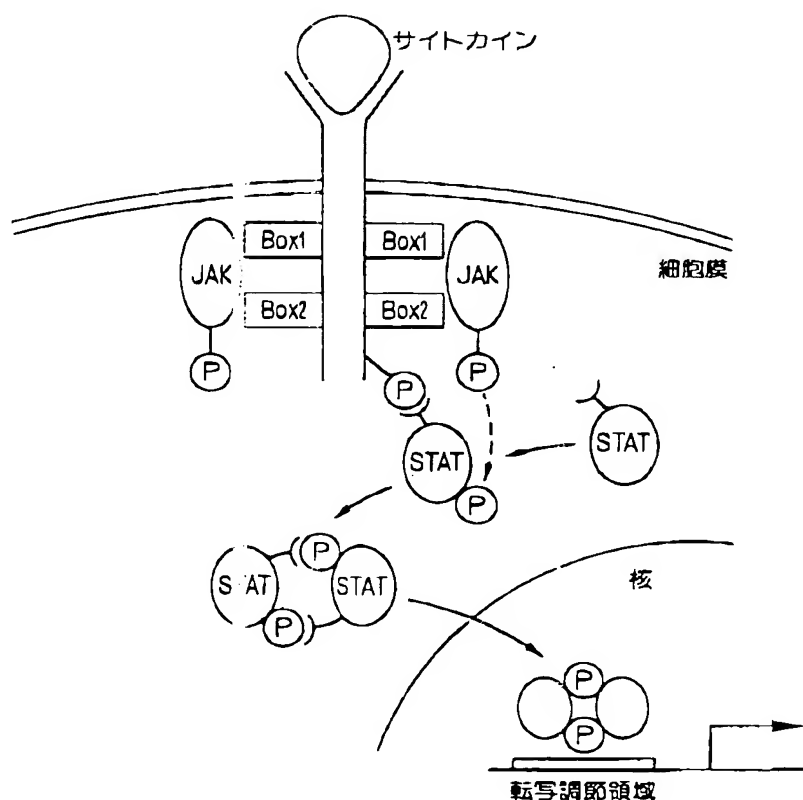
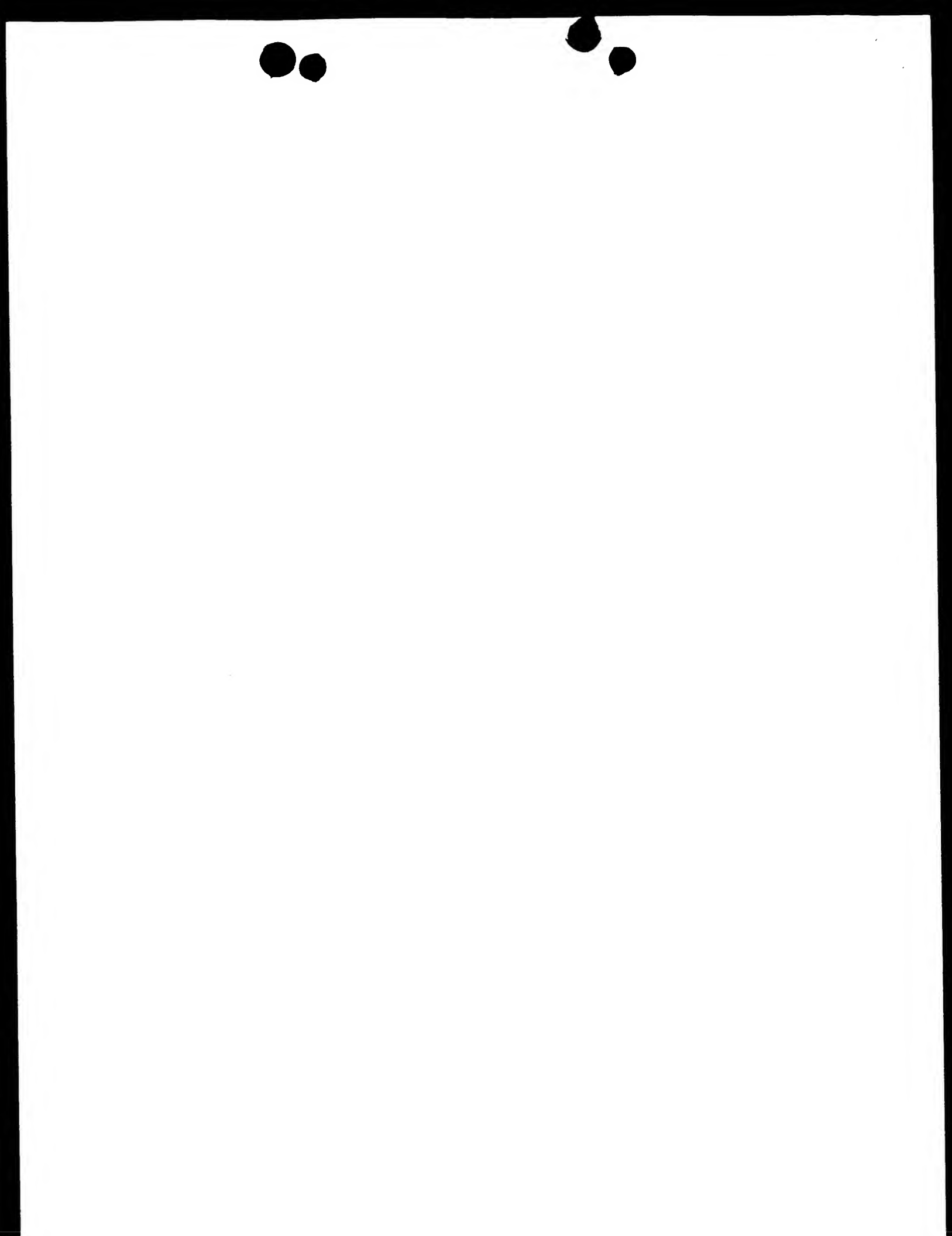


図 2. JAK-STAT 系のシグナル伝達経路





クリン D1 の転写活性と蛋白発現を減弱させ、細胞周期の G1 期から S 期を抑制している。TGF- $\beta$  の細胞周期抑制作用は、構造的不活性型の TAK1, MKK3/6 と p38K の co-transfection により減弱することから、少なくとも一部は TAK1, MKK3/6 と p38K のキナーゼカスケードを介していると考えられる。また MEK1, ERK の活性が実験腎炎の糸球体において持続的に活性化されることを報告しており、ERK ファミリーの調整はメサンギウム細胞増殖調整の key factor と考えられ、糸球体腎炎の病態に関与している可能性がある。また糖尿病の病態でおこりうる高血糖による刺激が JNK の活性を上昇させるという報告が *in vivo* と *in vitro* の系で報告されている<sup>9)</sup>。

尿細管細胞における MAP キナーゼファミリーの役割は不明な点が多いが、集合尿細管で高浸透圧刺激にて、ERK, JNK, p38K の活性が増加することを Itoh らのグループや、著者らのグループが報告している<sup>8,9)</sup>。また、MDCK 細胞において AVP (arginine vasopression) が EGF による ERK の活性を抑制するという報告がある<sup>10)</sup>。近位尿細管細胞においてもアンジオテンシン II が ERK カスケードを活性化させることが報告されている<sup>11)</sup>。

MAP キナーゼファミリーは、ここ数年で急速に解明されてきた情報伝達系であり、腎での生理、病態に及ぼす役割は上記した基礎的な検討が示されているのみである。メサンギウム細胞の増殖や、尿細管細胞の高浸透圧への対応、高血糖の糖尿病の病態で重要な key factors であろうことは確かと考えられる。今後の研究の成果により、腎臓病の病態の理解、診断、治療に有用な情報をもたらすことが期待される。

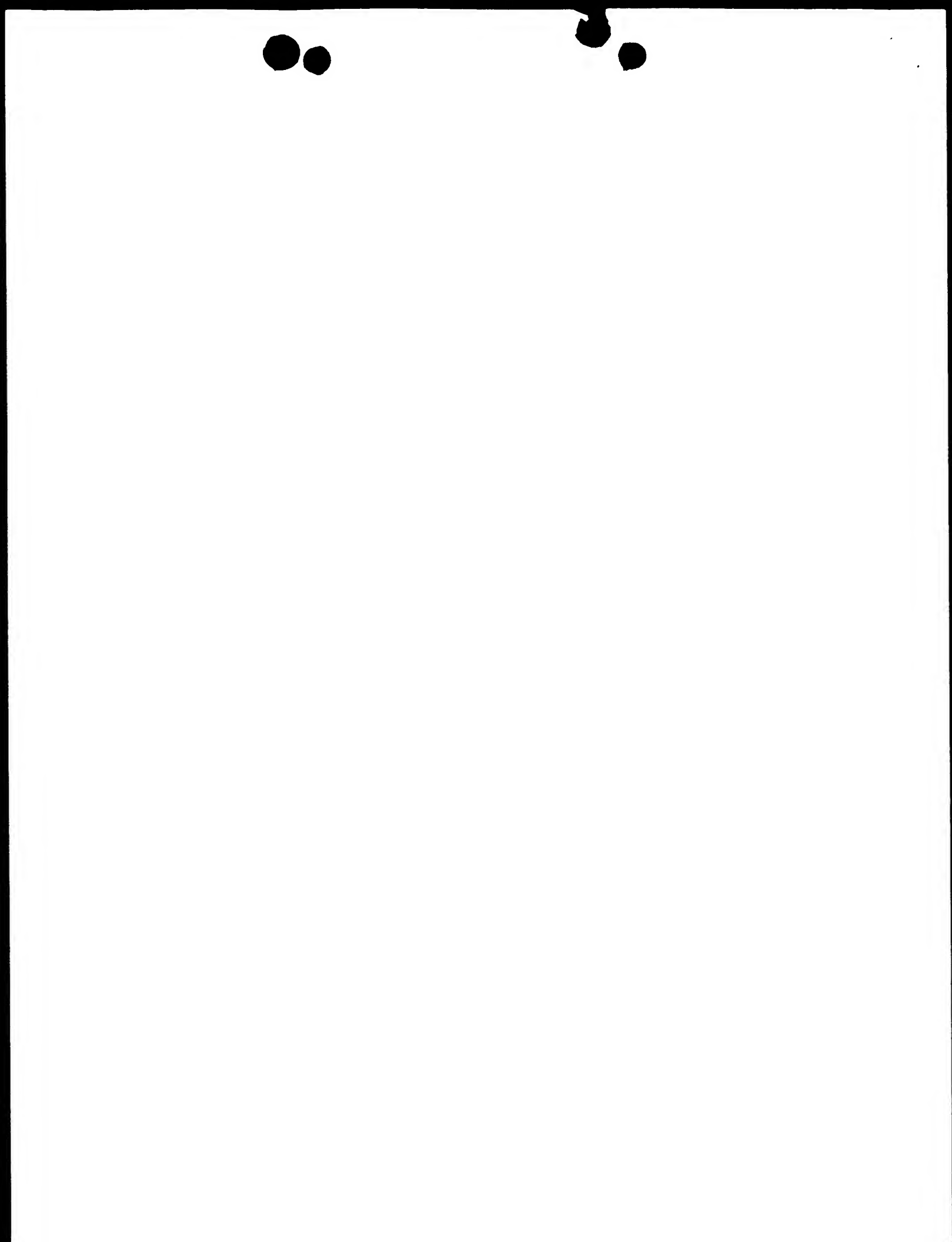
### JAK-STAT 系

インターロイキン、インターフェロンなどのサイトカインは、構造の類似した受容体を介して、細胞内に情報を伝達する。受容体はリガン

ドが結合すると、オリゴマーを形成し、細胞内ドメインの一部にチロシンキナーゼの一種である JAK (janus kinase) が結合することにより、細胞内へのシグナル伝達を開始される。受容体に結合して、JAK キナーゼはリン酸化され、活性化される。現在のところ、少なくとも 4 種類の JAK キナーゼファミリー (JAK1, 2, 3, および Tyk2) の存在が知られている。JAK ファミリーは、その下流で STAT とよばれる転写因子をリン酸化する。STAT は、現在までに少なくとも、6 種類 (STAT1-6) が報告されており、サイトカインはそれぞれに特異的な STAT のリン酸化を誘導する。腎疾患に関与する STAT の報告としては、メサンギウム細胞において、Abboud らのグループが、JAK1-STAT1 の活性化が PDGF により引き起こされることを報告している<sup>12)</sup>。STAT は DNA 結合ドメインと、SH2 および SH3 ドメインをもち、チロシン残基がリン酸化され活性化する。リン酸化された STAT は、ホモダイマーあるいはヘテロダイマーを形成し、核内に移行して標的遺伝子の転写を調整すると考えられる (図 2)。STAT を前述の ERK がリン酸化し、DNA への結合能を高めるという報告がある。

### cGMP-G-キナーゼ

cGMP は、ANP, BNP, CNP などの Na 利尿ホルモンの、あるいは NO のセカンドメッセンジャーとして知られている。cGMP はその下流の G-キナーゼを活性化し、生理作用を発現する。cGMP-G-キナーゼ系は集合尿細管における水、Na 利尿を引き起こすほか、最近では、メサンギウム細胞の弛緩や増殖抑制に関与するという報告がある<sup>13)</sup>。著者らは、G-キナーゼを組み込んだアデノウイルスを用いて、メサンギウム細胞に、G-キナーゼを強制発現させたところ、サイクリン E の転写抑制を介して、メサンギウム細胞の増殖抑制を引き起こすことを報告している<sup>14)</sup>。また羽田らは、cGMP と cAMP



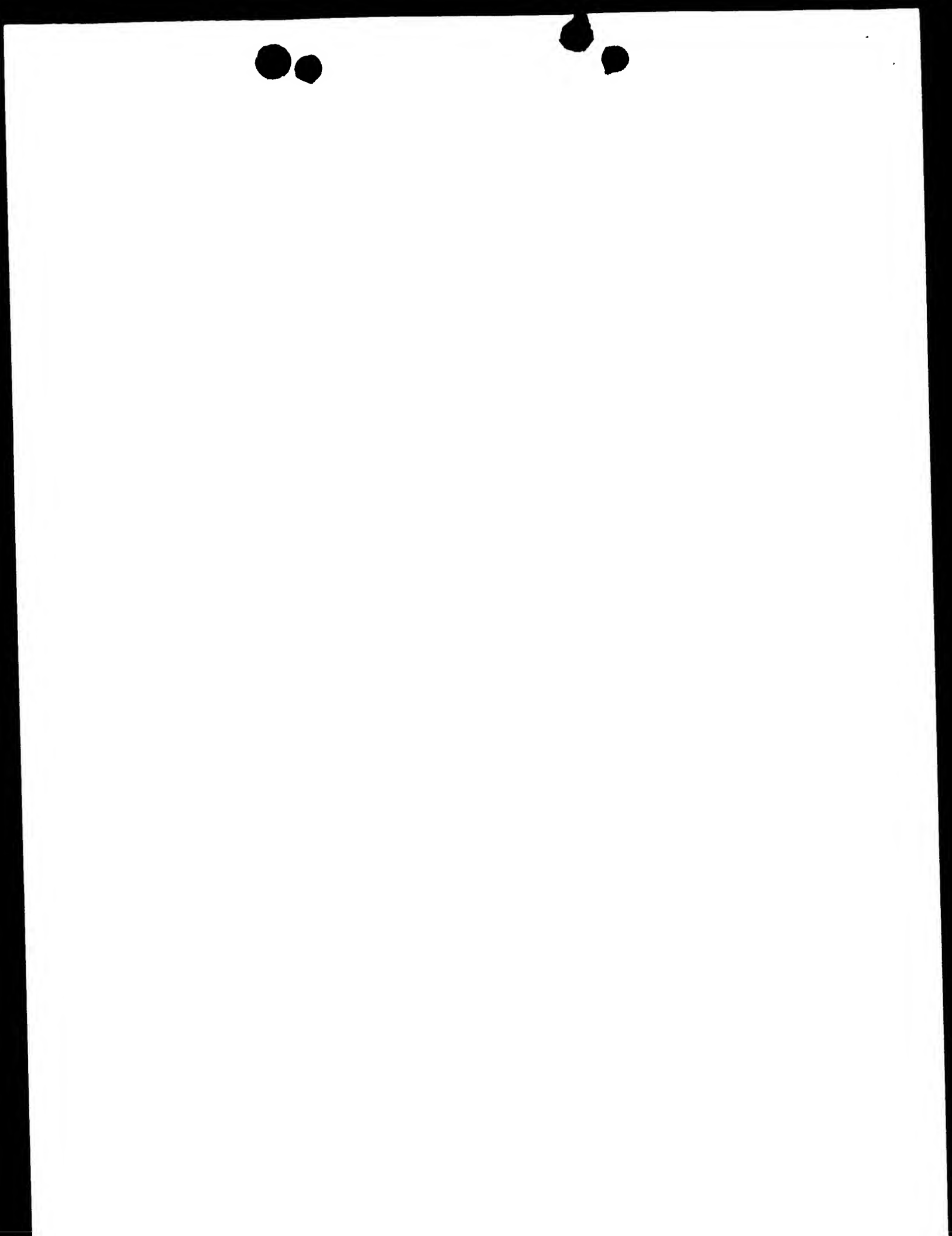
が、MAP キナーゼの抑制を起こすことを報告しており、cGMP-G-キナーゼ系がMAP キナーゼやサイクリンなどの細胞増殖刺激に対して、抑制的な役割をはたしている可能性が高い<sup>15)</sup>。in vivo の腎炎モデルにおいても、向山らは、BNP のトランスジェニックマウスを用いて、BNP-cGMP の過剰発現が、腎炎の発症に抑制的に働くことを報告している<sup>16)</sup>。

### 結 語

MAP キナーゼファミリー、JAK-STAT、cGMP-G キナーゼ系などの細胞内情報伝達系は、ここ数年で急速に解明されてきているが、腎での生理、病態に及ぼす役割は不明な点が多い。メサンギウム細胞の増殖、形質転換や、尿細管細胞の高浸透圧への対応、高血糖の糖尿病の病態において、これらの情報伝達系が、重要なkey factorsであろうことは確かと考えられる。今後の研究の成果により、腎臓病の病態の理解、診断、治療に有用な情報をもたらすことが期待される。

### 文 献

- 1) Bokemeyer D *et al* : Multiple intracellular MAP kinase signaling cascades. *Kidney Int* 49 : 1187, 1996.
- 2) Bokemeyer D *et al* : Activation of extracellular signal-regulated kinase in proliferative glomerulonephritis in rats. *J Clin Invest* 100 : 582, 1997.
- 3) Terada Y *et al* : TAK1-MKK6-P38/HOG MAPK pathway inhibited cyclin D1 expression and cell cycle progression in LLC-PK1 cells : opposite effect to P42/44 MAPK pathway. *Kidney Int* 56 : 1378, 1999.
- 4) Hibi M *et al* : Identification of an oncoprotein and UV responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 7 : 2135, 1993.
- 5) Han J *et al* : A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265 : 808, 1994.
- 6) Terada Y *et al* : Presence and regulation of Raf-1-K (Kinase), MAPK-K, MAP-K, and S6-K in rat nephron segments. *J Am Soc Nephrol* 6 : 1565, 1995.
- 7) Haneda M *et al* : Activation of mitogen-activated protein kinase cascade in diabetic glomeruli and mesangial cells cultured under high glucose conditions. *Kidney Int* 60 : S66, 1997.
- 8) Ito T *et al* : Mitogen-activated protein kinase and its activator are regulated by hypertonic stress in Madin-Darby kidney cells. *J Clin Invest* 93 : 2387, 1994.
- 9) Terada Y *et al* : Sequential activation of Raf-1 kinase, mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase, MAP kinase, and S6 kinase by hyperosmolality in renal cells. *J Biol Chem* 269 : 31296, 1994.
- 10) Yamada T *et al* : AVP inhibits EGF-stimulated MAP kinase cascade in Madin-Darby canine kidney cells. *Kidney Int* 48 : 745, 1995.
- 11) Terada Y *et al* : Sequential activation of MAP kinase cascade by angiotensin II in opossum kidney cells. *Kidney Int* 48 : 1801, 1995.
- 12) Choudhury GG *et al* : PDGF stimulates tyrosine phosphorylation of JAK 1 protein tyrosine kinase in human mesangial cells. *Kidney Int* 49 : 19, 1996.
- 13) Isono M *et al* : Atrial natriuretic peptide inhibits endothelin-1-induced activation of JNK in glomerular mesangial cells. *Kidney Int* 53 : 1133, 1998.
- 14) Hanada S *et al* : Overexpression of G-kinase using adenovirus inhibits rat mesangial cell cycle via inhibition of cyclin E transcription. *J Am Soc Nephrol* 10 : 476, 1999 (abstract).
- 15) Haneda M *et al* : Differential inhibition of mesangial MAP kinase cascade by cyclic nucleotides. *Kidney Int* 50 : 384, 1996.
- 16) Suganami T *et al* : Chronic excess of brain natriuretic peptide in transgenic mice ameliorates proteinuria and mesangial cell proliferation in anti-GBM nephritis. *J Am Soc Nephrol* 10 : 462, 1999 (abstract).



# 32 卷 4 号

# 特集 MMP と疾患—基礎と臨床

## □ 鼎 談

早 川 太 郎 (愛知学院大学歯学部 生化学)  
 清 木 元 治 (東京大学医科学研究所 癌細胞学)  
 (司会) 岡 田 保 典 (慶應義塾大学 病理学)

## □ 基 礎

オーバービュー：MMP 研究の新展開  
 MMP 遺伝子発現機構  
 MMP の活性化機構  
 癌細胞浸潤と MMP  
 血管新生と MMP  
 マトリクラインと MMP  
 生殖機能と MMP  
 MMP 遺伝子ノックアウトマウスの現状  
 MMP インヒビター開発の現状  
 ADAM と MMP の接点  
 TIMP の多彩な機能

清 木 元 治 (東京大学医科学研究所 癌細胞学)  
 佐 藤 博 (金沢大学がん研究所 腫瘍分子科学)  
 伊 藤 義 文 (東京大学医科学研究所 癌細胞学)  
 鍋 島 一 樹 (富山医科大学 第三病理)  
 佐 藤 靖 史 (東北大学加齢医学研究所)  
 服 部 高 子 (岡山大学歯学部 口腔生化学)  
 佐 藤 隆 (東京薬科大学薬学部 生化学)  
 岡 田 明 子 (東京大学医科学研究所 癌細胞学)  
 中 島 元 夫 (ノバルティスファーマ 筑波研究所)  
 丹 沢 和比古 (三井株式会社 第二生物研究所)  
 早 川 太 郎 (愛知学院大学歯学部 生化学)

## □ 臨 床

オーバービュー：MMP の疾患とのかかわり  
 慢性関節リウマチと MMP  
 骨吸収と MMP  
 呼吸器疾患と MMP  
 HAM における MMP の役割  
 癌の浸潤・転移と MMP  
 消化器癌細胞浸潤・転移と MMP  
 MMP/TIMP と動脈硬化  
 肝疾患とコラゲナーゼ  
 MMP と TIMP のアッセイ法

岡 田 保 典 (慶應義塾大学 病理学)  
 吉 原 愛 雄 (防衛医科大学校 整形外科)  
 下 赤 隆 (東京大学 整形外科)  
 岡 田 信 司 (東北大学 第一内科)  
 梅 原 藤 雄 (鹿児島大学 第三内科)  
 中 村 博 幸 (慶應義塾大学 病理学)  
 伊 東 文 生 (札幌医科大学 第一内科)  
 豊 岡 照 彦 (東京大学 循環器内科)  
 岡 崎 照 (東海大学 地域保健学)  
 藤 本 昇 (富士薬品工業株式会社 バイオ医薬部)

## □ 話題の窓

最新国際学会情報

## □ 学会だより・留学記・症例

現代医療 2000 年 3 月号 Vol. 32 No. 3

平成 12 年 3 月 10 日発行(毎月 1 回、10 日発行)

定価(本体 2,500 円+税)送料実費

平成 12 年年間予約購読料

本体 34,200 円+税(送料弊社負担)

振替口座 00180-2-24642 番

編集人 田上 龍男, 盛光 哲夫

発行人 永田 忠直

発行所 株式会社 現代医療社

〒101-0041 東京都千代田区神田須田町 2-5

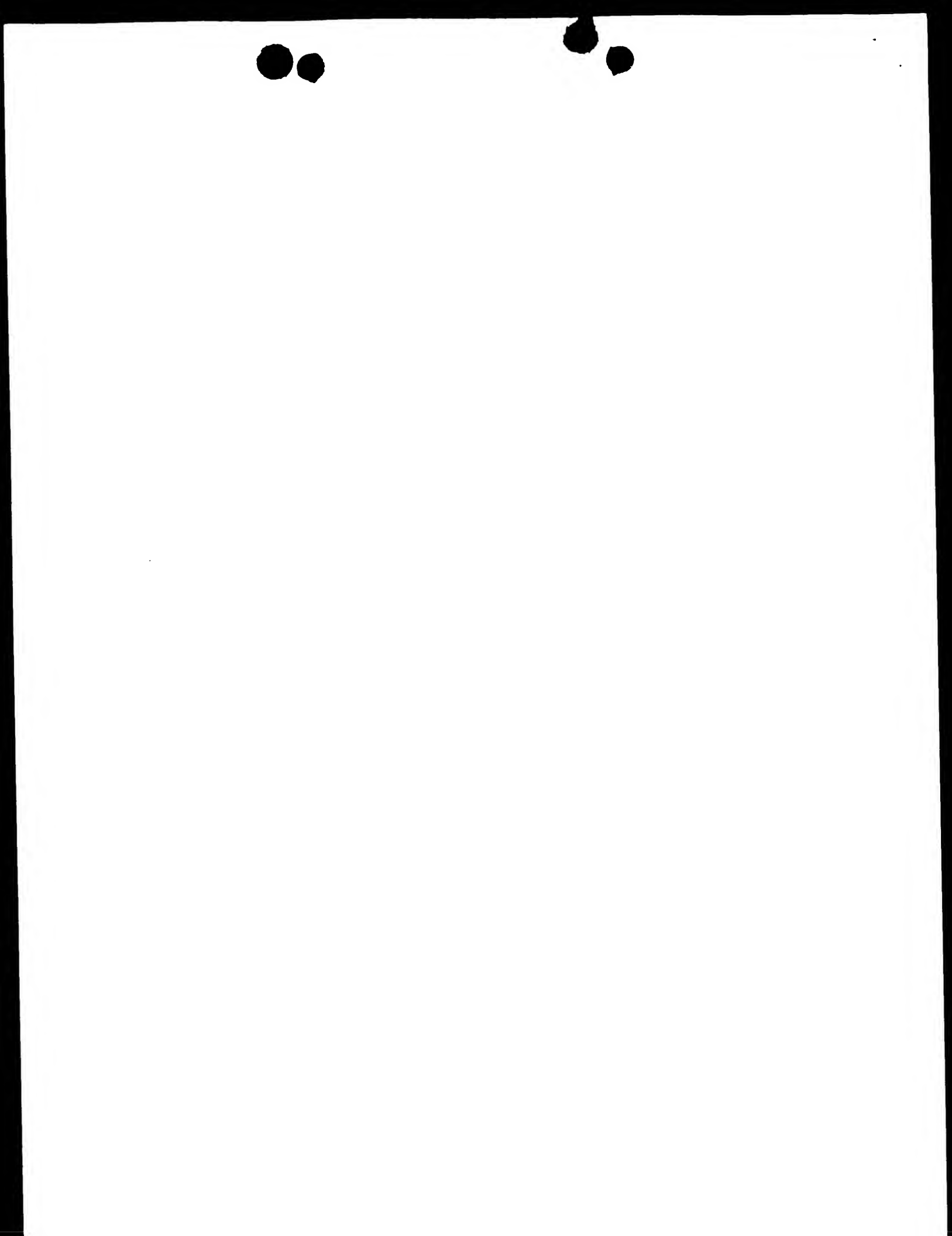
TEL (03) 5296-3771(代)

FAX (03) 5296-3770

印刷所 大昭和印刷株式会社

© Gendai Iryo, 2000. Printed in Japan

本書内容を無断で複写・複製・転載すると著作権・出版権の侵害となることがありますのでご注意ください。



PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



<p>(51) 国際特許分類7 C12N 15/12, C07K 14/435, C12N 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P 21/02, C07K 16/18, G01N 33/53, 33/50, A01K 67/027</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/66729</p> <p>(43) 国際公開日 2000年11月9日(09.11.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/02831</p> <p>(22) 国際出願日 2000年4月28日(28.04.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/123561 1999年4月30日(30.04.99) JP</p> <p>(71) 出願人 ; および (72) 発明者 宮田敏男(MIYATA, Toshio)[JP/JP] 〒259-1117 神奈川県伊勢原市東成瀬4-2-3-101 Kanagawa, (JP)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 黒川 清(KUROKAWA, Kiyoshi)[JP/JP] 〒162-0061 東京都新宿区市谷柳町49 市ヶ谷ヒルズ401 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: MEG-3 PROTEIN</p> <p>(54)発明の名称 メグ-3タンパク質</p> <p>(57) Abstract A DNA expressed in mesangial cells at a high frequency; and a protein (Meg-3) encoded by this DNA. These substances are useful in identifying mesangial cells and detecting abnormalities, etc. in mesangial cells. Moreover, it is expected that the functions of mesangial cells will be disclosed on the basis of the function of the above protein and thus pathogenesis of diseases relating to mesangial cells will be clarified. Also, above substances are expected as being applicable to the treatment and diagnosis of diseases relating to mesangial cells, etc.</p>		

(57)要約

本発明は、メサンギウム細胞で高頻度に発現している DNA、そしてこの DNA がコードするタンパク質（メグー 3）を提供する。これらは、メサンギウム細胞の同定、メサンギウム細胞の異常の検出などに有用である。更に、該タンパク質の機能からメサンギウム細胞の機能が明らかになり、メサンギウム細胞に関連する疾患の原因究明への展開が期待される。また、メサンギウム細胞に関連する疾病の治療、診断等への応用が期待される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CJ	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		



## 明細書

## メグー 3 タンパク質

技術分野

本発明は、遺伝子工学の分野に属し、特に腎細胞の遺伝子の単離に関する。

背景技術

体内の 60 兆個もの様々な細胞が、本質的に同一のゲノム DNA を有している。正常な生理学的機能のために、これらの遺伝子の発現は、細胞系統、および細胞が受容するシグナルにより厳密に制御されている。従って、個々の細胞型に発現している遺伝子を解明することは極めて重要である。

メサンギウム細胞(mesangial cell)は、腎糸球体の構造および機能の維持に中心的な役割を果たしている。そしてメサンギウム細胞は、各種腎炎においても中心的な病態生理学的意義を有する。例えばメサンギウム細胞の増殖、および細胞外の糸球体間質マトリックスの蓄積は、慢性腎炎および糖尿病性腎症のような様々な糸球体疾患の患者の糸球体硬化症の重要な病理所見である。従って、メサンギウム細胞で発現している遺伝子を見だしその機能を明らかにすることは、メサンギウム細胞の生物学的性質の解明、メサンギウム細胞に関連する疾患の原因の究明、ひいては、メサンギウム細胞に関連する疾病の治療、診断等に有効である。

メサンギウム細胞のマーカーとしては、ラットでは Thyl 抗原が知られている。しかしこの遺伝子はメサンギウム細胞特異的ではないうえ、ヒトではメサンギウム細胞には発現していない (Miyata T. et al., Immunology(1989); 67: 531-533; Miyata T. et al., Immunology(1990); 69: 391-395)。また、メサンギウム細胞は活性化されると  $\alpha$  平滑筋アクチンを発現することが知られているが、この遺伝

子もメサングウム細胞特異的ではない。このように、メサングウム細胞に特徴的な遺伝子については、従来報告がなかった。

なお本発明者は、先にメサングウム細胞に特異的に発現しているタンパク質としてメグシンを報告している (J. Clin. Invest, 1998 Aug 15, 120:4, 828-36)。本発明は、このメグシンとも明確に異なった構造を持つ新規なタンパク質に関する。

### 発明の開示

本発明は、メサングウム細胞で高度に発現される遺伝子を単離することを課題とする。

本発明者は、ヒトメサングウム細胞のインビトロ培養物から mRNA を単離し、3' 側の cDNA ライブラリーを作成した。そしてこの cDNA ライブラリーに含まれる多数のクローンをランダムに選択してその塩基配列を決定した。次いで決定した塩基配列を、種々の臓器及び細胞から得られた既知の 3' 側の cDNA クローンの塩基配列と比較することによって、メサングウム細胞で特異的に発現しているクローンを選択した。そしてメサングウム細胞から調製した  $\lambda$  ZIPLox cDNA ライブラリーを、このクローンのインサートをプローブとしてスクリーニングし、ポジティブクローンの全塩基配列 (3768bp) を決定して本発明を完成した。更に Kozak の翻訳開始コドンを含む最も長いオープンリーディングフレームに基づくアミノ酸配列を決定した。この推定アミノ酸配列を持つ本発明によるタンパク質を、本発明者はメグー 3 (Meg-3) と命名した。ヒト・メグー 3 の cDNA の塩基配列を配列番号：1 に、ヒト・メグー 3 の推定アミノ酸配列を配列番号：2 に示した。配列番号：1 に示す塩基配列に対して相同性を持つ塩基配列は、配列番号：1 の 3' 末端から 300～500 塩基に対して 90% 以上のホモロジーを持つ EST が検索された他には確認することができなかった。

このアミノ酸配列について、SwissProt データベースのアミノ酸配列とホモロジー検索を行い、メグー 3 が新規なタンパク質であることを確認した。更に本発

明のメグー 3 の推定アミノ酸配列についてモチーフ検索を試みたところ、N 末端から数えて 500 番目以降の領域において、proline rich protein と呼ばれる多くのタンパク質と良く似たアミノ酸配列が見出された。特に 621 番目～701 番目に至る 81 アミノ酸残基からなる領域は、プロリンに富み (27.2%)、SH3 (Src homology 3) ドメインに結合する proline rich ペプチド (PR ペプチド) のアミノ酸配列 (xPxxPPPFxP) に類似するアミノ酸配列 (xPESPPPAxP) を 2ヶ所に有する。このことから、メグー 3 タンパク質の C 末端構造は、PR ドメインとして Src ファミリーなどの細胞内シグナル伝達物質の SH3 ドメインに結合できる可能性、そしてシグナル伝達系に関与する可能性が示唆された。配列番号：2 のアミノ酸配列からなるタンパク質の細胞質局在の可能性が高い (52.2%) ことから、メグー 3 がシグナル伝達に関与する可能性が大きいことが示唆される。この領域の他 (N 末端から 1～550 番目のアミノ酸) では、特に相同性の高いアミノ酸配列を見出すことはできなかった。

ヒトの初代培養細胞においては、メグー 3 遺伝子がメサンギウム細胞で特に高度に発現していることが特徴的である。その他の初代培養細胞では、腎皮質上皮細胞や繊維芽細胞で発現が観察され、ヒトの臍帯静脈内皮細胞や平滑筋細胞においてはわずかな発現が観察される。更にノーザンブロッティングによりメグー 3 の組織分布をみたところ、メグー 3 は胎盤、次いで脾において高度な発現が観察される。その他、腎、肺、および心では弱い発現が見られ、肝、および骨格筋ではわずかな発現が観察されるのみである。脳では、メグー 3 の発現は検出できない。本発明はこれらの知見に基づいて完成されたものである。

すなわち、本発明は具体的には以下のタンパク質、DNA、並びにそれらの用途に関する。

〔1〕配列番号：2 に記載のアミノ酸配列、またはこれらアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列を含み、このアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパ

ク質。

〔2〕 配列番号：2のアミノ酸配列を含む〔1〕のタンパク質。

〔3〕 〔1〕に記載のタンパク質をコードするDNA。

〔4〕 配列番号：1の塩基配列を含む〔3〕記載のDNA。

〔5〕 配列番号：1の塩基配列を持つDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、〔1〕に記載のタンパク質またはこれらタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNA。

〔6〕 〔4〕に記載のDNAと特異的にハイブリダイズするDNAであって、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を持つDNA。

〔7〕 〔4〕に記載のDNAもしくはその一部に対するアンチセンスDNA。

〔8〕 〔3〕、〔4〕、および〔5〕のいずれかに記載のDNAを含むことを特徴とするベクター。

〔9〕 〔3〕、〔4〕、および〔5〕のいずれかに記載のDNAを発現可能に保持する形質転換細胞。

〔10〕 〔9〕に記載の形質転換細胞を培養し、〔3〕、〔4〕、および〔5〕のいずれかに記載のDNAの発現産物を回収することを特徴とする、〔1〕に記載のタンパク質の製造方法。

〔11〕 〔6〕のDNAを含むメサングウム細胞の検出用試薬

〔12〕 〔1〕に記載のタンパク質に結合することを特徴とする抗体。

〔13〕 配列番号：2のアミノ酸配列から選択されたアミノ酸配列を持つタンパク質の一部を認識する〔12〕の抗体。

〔14〕 抗体がモノクローナル抗体である〔13〕の抗体。

〔15〕 〔13〕または〔14〕のいずれかに記載の抗体と〔2〕のタンパク質、またはその断片との免疫学的な結合に基づいて〔2〕のタンパク質またはその断片を測定する免疫学的測定方法。

〔16〕 〔12〕～〔14〕のいずれかに記載の抗体を含む、メサングウム細胞の

検出用試薬。

〔17〕生体試料中に含まれる〔2〕のタンパク質またはその断片を測定し、正常試料から得られた測定値と比較することによってメサングウム増殖性腎症を検出する方法。

〔18〕メグー 3 をコードする遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

〔19〕非ヒト脊椎動物がマウスである〔18〕のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

〔20〕メグー 3 をコードする遺伝子の発現が抑制されたノックアウトマウスである〔19〕のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

前記課題を達成するために本発明者は、3' 領域 cDNA ライブラリー (3'-directed cDNA library) を用いた。この方法により、cDNA の大きさによって左右されるクローニング効率の変動を回避することができる。3' 領域の配列は遺伝子に特有なものであり、約 200~300bp の配列データは、遺伝子の特徴を明らかにするのに充分である (Yasuda Y., Miyata T. et al., Kidney Int, 1998 Jan, 53:1, 154-8)。

本発明のヒト・メグー 3 をコードする DNA は、メサングウム細胞から mRNA を調製した後、既知の方法により二本鎖 cDNA に変換することにより得ることができる。

mRNA の調製はグアニジンイソチオシアネート-塩化セシウム法 [Chirwin, et al.

Biochemistry 18, 5294 (1979)]、デオキシリボヌクレアーゼ存在下に界面活性剤処理、フェノール処理を行なう方法 [Berger & Birkenmeier, Biochemistry 18,

5143 (1979)] などを用いることができる。全 RNA からの poly(A)<sup>+</sup>RNA の調製はオリゴ(dT)を結合した担体 (例えばセファロース、セルロースやラテックス粒子等) を用いたアフィニティークロマトグラフィーなどを用いて行なうことができる。

得られた mRNA を鋳型として、3' 端にある poly(A) 鎖に相補的なオリゴ(dT)、ランダムプライマー、あるいはメグー 3 のアミノ酸配列の一部に相応する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして逆転写酵素で処理することによって cDNA

(1st strand)を得ることができる。mRNA とそれに相補的な cDNA とで構成されるハイブリッドの mRNA を E. Coli RNase H で部分的に切断し、これをプライマーとして E. Coli DNA polymerase I により cDNA (2nd strand) が合成される。最終的に E. Coli DNA Ligase で処理することにより、二本鎖 cDNA を得ることができる。

ヒト・メグー 3 遺伝子塩基配列をもとに合成したプライマーを用いて、メサングウム細胞 poly (A)<sup>+</sup>RNA を鋳形にして RT-PCR 法によりクローニングすることも可能である。また、PCR によらず、ヒト・メグー 3 遺伝子塩基配列をもとにプローブを合成し、直接 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、目的とする cDNA を得ることもできる。本発明の遺伝子は、これらの方法により得られた遺伝子の中から、その遺伝子の塩基配列を確認することにより、選択することができる。マウスとラット等、ヒト以外の種におけるメグー 3 のホモログについても、同様の手法により cDNA の取得が可能である。

あるいは、メグー 3 のホモログの cDNA を以下のような手法によって単離することも可能である。すなわち、前記ヒト・メグー 3 cDNA の塩基配列をプローブとして用い、cDNA ライブラリーをコロニーハイブリダイゼーションやプラークハイブリダイゼーションによってスクリーニングして、メグー 3 のホモログをコードする cDNA を単離することができる。cDNA ライブラリーは、マウス、ラットの組織や、培養メサングウム細胞等から抽出した mRNA を鋳型として合成することができる。あるいは、市販 cDNA ライブラリー（フナコシ製等）を用いることもできる。この他に、本発明によるヒト・メグー 3 の cDNA をもとに、オープンリーディングフレームの前後にディジェネレーティブプライマーを設計し、これを利用した PCR によってホモログの cDNA を増幅する方法を用いることもできる。

ヒト・メグー 3 ゲノムは、ゲノミックライブラリーのスクリーニングによって得ることができる。ゲノミックライブラリーは、たとえばヒト B リンパ芽球からゲノムを調製し、Sau3 で部分的に切断した DNA をファージベクターである EMBL3 に組み込むことにより合成することができる (Blood, vol 83, No 11, 1994: pp

3126-3131)。このようなゲノミックライブラリーについて、プラークハイブリダイゼーション法（新細胞工学実験プロトコール、秀潤社、pp79-92、参照）を行えば、目的とするゲノムを含むクローンを取得できる。プローブとしては、メグー 3 cDNA のオープンリーディングフレーム全ての領域（2202bp）、または cDNA 部分をプライマーとしてヒトゲノム DNA を PCR 法を用いて増幅することにより得られた各エキソン-イントロン部分を用いることができる。また、同時に調節領域に関しても、ヒト培養メサンギウム細胞由来 mRNA、もしくはヒト腎臓 mRNA（Clontech 社より購入）を鋳型として、5' RACE 法（5'-Full RACE Core Set（宝酒造（株）の方法に従う））を用いて 5' UTR の配列決定を行うことができる。

本発明の遺伝子は、例えばホスホアミダイド法 [Mattencchi, M. D. & Caruthers, M. H. J. Am. Chem. Soc. 103, 3185 (1981)]、ホスファイト・トリエステル法 [Hunkapiller, M. et al. Nature 310, 105 (1984)] 等の核酸の化学合成を用いる常法に従って製造することもできる。

なお、一般に、真核生物の遺伝子はヒトインターフェロン遺伝子で知られているように多形現象を示すことが多い。この多形現象によって、アミノ酸配列に 1 個あるいはそれ以上のアミノ酸の置換を生じても、通常タンパク質の活性は維持される。また一般に、1 個または数個のアミノ酸の改変では、タンパク質の活性は維持される場合が多いことが知られている。従って、配列番号：2 に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を人工的に改変したものをを用いて得られたタンパク質をコードする遺伝子は、該タンパク質が本発明の遺伝子の特徴的な機能を有する限り、すべて本発明に含まれる。また、配列番号：2 に示されるアミノ酸配列を人工的に改変したタンパク質は、本発明のタンパク質の特徴を有する限り、すべて本発明に含まれる。

その他、本発明のタンパク質には、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列、またはこれらアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列を含み、本発明によるメグー 3 と機能的

に同等なタンパク質が含まれる。なお本発明において機能的に同等とは、メグー 3 と同等の生物学的特性を持つことを意味する。本発明者は、メグー 3 にたとえば以下のような生物学的な特性を見出している。

まずメグー 3 は、SH3 ドメインとの結合性が推測される PR ドメインを備えていることから、シグナル伝達系に関与する可能性がある。SH3 ドメインは、Src ファミリーなどをはじめとして、各種細胞内シグナル伝達物質が有するドメインの一つである。配列番号：2 のアミノ酸配列からなるタンパク質の細胞質局在の可能性が高い(52.2%)ことから、メグー 3 がシグナル伝達に関与する可能性が大きいことが示唆される。

またメグー 3 は、次のような発現特性を持っている。まず、ヒトの初代培養細胞においては、メグー 3 遺伝子がメサングウム細胞で特に高度に発現していることが特徴的である。その他の初代培養細胞では、腎皮質上皮細胞や繊維芽細胞で発現が観察され、ヒトの臍帯静脈内皮細胞や平滑筋細胞においてはわずかな発現が観察される。更にノーザンブロットイングによりメグー 3 の組織分布をみたところ、メグー 3 は胎盤、次いで脾において高度な発現が観察される。その他、腎、肺、および心では弱い発現が見られ、肝、および骨格筋ではわずかな発現が観察されるのみである。脳では、メグー 3 の発現は検出できない。各組織におけるメグー 3 の発現状態は、たとえば配列番号：1 から選択された塩基配列を持つプローブによって、各組織から調製した mRNA を試料としてノーザンブロットアッセイを行うことによって知ることができる。

以上のような生物学的特性について、機能的に同等なタンパク質は、いずれも本発明によるメグー 3 を構成する。したがって、具体的に構造を明らかにしたヒトのメグー 3 のみならず、構造的にあるいは機能的に同等な他の種のホモログは本発明に含まれる。

また、本発明の DNA には、これらの機能的に同等なタンパク質をコードする DNA が含まれる。これらのタンパク質をコードする DNA は、cDNA のみならずゲノム



DNA や合成 DNA であることもできる。

また、所望のアミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる [Grantham, R. et al. Nucleic Acids Res. 9, r43 (1981)]。従って、コドンの縮重を考慮して、DNA を適宜改変したものもまた本発明の DNA に含まれる。所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用した部位特異的変位導入法 (sitespecific mutagenesis) [Mark, D.F. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 5662 (1984)] 等にしながら、これら核酸配列のコドンを一部改変することができる。

更に、配列番号：1 に記載の塩基配列を含む DNA とハイブリダイズすることができ、かつその DNA によってコードされるタンパク質が本発明によるメグー 3 に特徴的な機能を有する限り、その DNA は本発明による DNA に含まれる。ストリンジェントな条件下で特定配列にハイブリダイズすることができる配列は、特定配列がコードするタンパク質と類似した活性を持つものが多いと考えられる。ストリンジェントな条件とは、一般的には以下のような条件を示すことができる。すなわち、 $4 \times \text{SSC}$ 、 $65^\circ\text{C}$  でハイブリダイゼーションさせ、 $0.1 \times \text{SSC}$  を用いて  $65^\circ\text{C}$  で 1 時間洗浄する。ストリンジェンシーを大きく左右するハイブリダイゼーションや洗浄の温度条件は、融解温度 ( $T_m$ ) に応じて調整することができる。 $T_m$  はハイブリダイズする塩基対に占める構成塩基の割合、ハイブリダイゼーション溶液組成 (塩濃度、ホルムアミドやドデシル硫酸ナトリウム濃度) によって変動する。したがって、当業者であればこれらの条件を考慮して同等のストリンジェンシーを与える条件を経験的に設定することができる。

変異体も含め本発明による DNA の塩基配列は、公知の技術に基づいてさまざまな用途に利用することができる。

このようにしてクローン化されたメグー 3 をコードする遺伝子は適当な発現ベクター DNA に組み込むことにより、他の原核細胞または真核細胞の宿主を形質転

換させることができる。さらに、これらの発現ベクターに適当なプロモーターおよび形質発現に係る配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現することが可能である。発現ベクターとしては、例えば大腸菌の場合は、pET-3 [Studier & Moffatt, J. Mol. Biol. 189, 113(1986)] 等が、COS 細胞の場合は pEF-BOS [Nucleic Acids Research 18,5322 (1990)]、pSV2-gpt [Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A. 78, 2072 (1981)] 等が、CHO 細胞の場合は pVY1 [国際公開第 89/03874 号公報] 等がそれぞれ挙げられる。また、目的とする遺伝子に他のポリペプチドをコードする遺伝子を連結して融合タンパク質として発現させることにより、精製を容易にし、その後目的タンパク質を切り出すことも可能である。融合させるタンパク質としては、ヒスチジンタグ、c-myc タグ、MBP-タグ、あるいは GST-タグ等が知られている。これらのタグを融合させた状態でインサートを発現させることができるベクターは市販されている。

本発明の発現系に用いる宿主のうち原核生物宿主細胞としては、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) が挙げられる。また真核生物のうち、真核微生物の宿主細胞としては、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等が挙げられる。一方哺乳動物由来の宿主細胞としては、例えば COS 細胞、CHO 細胞、BHK 細胞等が挙げられる。なお、本発明の形質転換体の培養は、宿主細胞に適した培養条件を適宜選択して行なえばよい。

以上のようにして目的とするメグー 3 をコードする遺伝子で形質転換した形質転換体を培養し、産生されたメグー 3 は、細胞内または細胞外から分離し均一なタンパク質にまで精製することができる。なお、本発明の目的タンパク質であるメグー 3 の分離、精製は、通常のタンパク質で用いられる分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば各種クロマトグラフィー等を適宜選択し、組み合わせれば、メグー 3 を分離、精製することができる。

なお、上述の他、本発明の遺伝子、該遺伝子を含有する組換えベクター、該ベクターによる形質転換体および該遺伝子を用いたメグー 3 の製造過程における遺

伝子操作の処理手段は、「Molecular Cloning-A Laboratory Manual」(Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.) に記載の常法に従って行うことができる。

この他、配列番号：1 に記載の塩基配列に基づいて、メグー 3 遺伝子を検出するためのプローブを設計することができる。あるいは、これらの塩基配列を含む DNA や RNA を増幅するためのプライマーを設計することができる。与えられた塩基配列をもとに、プローブやプライマーを設計することは当業者が日常的に行っていることである。設計された塩基配列を持つオリゴヌクレオチドは化学合成によって得ることができる。そしてそのオリゴヌクレオチドに適当な標識を付加すれば、さまざまなフォーマットのハイブリダイゼーションアッセイに利用することができる。あるいは、PCR のような核酸の合成反応に利用することができる。プローブやプライマーに利用するオリゴヌクレオチドは、少なくとも 15 塩基、好適には 25-50 塩基の長さとするのが望ましい。

本発明によるメグー 3 遺伝子は、インサイチュハイブリダイゼーションの結果、腎臓の組織中では特にメサンギウム細胞で特異的に発現している。したがって、メグー 3 遺伝子に特異的にハイブリダイズする本発明に基づくオリゴヌクレオチドは、メサンギウム細胞の特異的な検出を可能とするプローブやプライマーとして有用である。メサンギウム細胞は腎糸球体機能と密接に関連していることから、本発明によるオリゴヌクレオチドは、腎臓の病理学的な解析において有用なツールとなりうる。

更に本発明が明らかにしたメグー 3 をコードする遺伝子の塩基配列に基づいて、メグー 3 の発現を制御しうるアンチセンス核酸が提供される。本発明によるアンチセンス核酸は、メグー 3 のメサンギウム細胞における役割を明らかにするための重要なツールとなる。あるいはメグー 3 の発現亢進によってもたらされる病態の制御に有用である。アンチセンス核酸が標的遺伝子の発現を抑制する作用としては、以下のような複数の要因が存在する。すなわち、三重鎖形成による転写開始阻害、RNA ポリメラーゼによって局所的に開状ループ構造がつけられた部位と

のハイブリッド形成による転写抑制、合成の進みつつある RNA とのハイブリッド形成による転写阻害、イントロンとエキソンとの接合点でのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、mRNA とのハイブリッド形成による核から細胞質への移行抑制、キャッピング部位やポリ(A)付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、開始コドン近傍のリボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、mRNA の翻訳領域やポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるタンパク質鎖に伸長阻止、および核酸とタンパク質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制、などである。これらは、転写、スプライシング、または翻訳の過程を阻害して、標的遺伝子の発現を抑制する(平島および井上「新生物化学実験講座 2 核酸 I V 遺伝子の複製と発現」, 日本生化学会編, 東京化学同人, pp. 319-347, 1993)。

本発明で用いられるアンチセンス配列は、上記のいずれの作用で標的遺伝子の発現を抑制してもよい。一つの態様としては、遺伝子の mRNA の 5' 端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的であろう。しかし、コード領域もしくは 3' 側の非翻訳領域に相補的な配列も使用し得る。このように、遺伝子の翻訳領域だけでなく非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含む DNA も、本発明で利用されるアンチセンス DNA に含まれる。使用されるアンチセンス DNA は、適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは 3' 側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。このようにして調製された DNA は、公知の方法で、所望の宿主へ形質転換できる。アンチセンス DNA の配列は、形質転換する宿主が持つ内在性遺伝子(あるいはその相同遺伝子)、またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有効に阻害できる限り、完全に相補的でなくてもよい。

アンチセンス DNA を鋳型として転写された RNA が、標的遺伝子の転写産物に対

して好ましくは90%、最も好ましくは95%の相補性を有するように設計する。アンチセンス配列を用いて、効果的に標的遺伝子の発現を阻害するには、アンチセンスDNAの長さは、少なくとも15塩基以上であり、好ましくは100塩基以上であり、さらに好ましくは500塩基以上である。通常、用いられるアンチセンスRNAの長さは2.5kbよりも短い。

更に本発明が提供するメグー3のcDNA塩基配列に基づいて、ゲノム中に存在するメグー3遺伝子のプロモーター領域、エンハンサー領域を取得することができる。具体的には、特開平6-181767号公報、「The Journal of Immunology(1995)155,2477-2486, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995), 92, 3561-3565」等と同様の方法でこれらの制御領域の取得が可能である。なお、本明細書において、プロモーター領域とは転写開始部位の上流に存在する遺伝子の発現を制御するDNA領域を、エンハンサー領域とはイントロンまたは3' UTRに存在する遺伝子の発現を制御するDNA領域をいう。

具体的には、プロモーター領域は、例えば、以下の方法によって取得することができる。

- 1) メグー3のcDNAの5'末端側をプローブとし、ヒトゲノムライブラリーよりメグー3のプロモーター領域をクローニングする。
- 2) 制限酵素消化してメグー3遺伝子の翻訳開始コドンを含むその上流部分(2~5 kbp)のプロモーター領域を含むDNAを得、塩基配列を決定する。ヒトメサングウム細胞から調製したpoly(A)<sup>+</sup>RNAを鋳型とし、メグー3遺伝子の5'末端側cDNA配列より選択したプライマーDNAを用いたプライマー伸長法により、転写開始点(+1)を決定する。塩基配列から転写因子結合配列を検索し、プロモーター活性を有する可能性がある箇所を予想する。
- 3) 2)で得たDNAからメグー3遺伝子のコード領域を除いたDNA断片をプラスミド上にサブクローニングし、このDNA断片の2~5 kbp下流に、レポーター遺伝子としてのクロラムフェニコールアセチル転位酵素(CAT)遺伝子、あるいは

は、ルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポータープラスミドを構築する。同様に、プロモーター領域の可能性のある各箇所を含むような形で、制限酵素消化により、或いは、PCRにより、5'末端側及び3'末端側を順次削ったメグー3遺伝子上流部分の様々な部位に該当するDNA断片を作成し、これらの下流に、レポーター遺伝子としてのCAT遺伝子、あるいは、ルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポータープラスミドを構築する。

4) 3) で作製したレポータープラスミドで形質転換した動物細胞のCAT或いはルシフェラーゼ活性を測定することにより、メグー3遺伝子上流部分に存在するプロモーター領域を得る。

また、3' UTR、イントロン中のエンハンサー領域は、メグー3 cDNA をプローブとし、ヒトゲノムライブラリーよりヒト・メグー3のゲノム遺伝子をクローニングし、上述のプロモーターに関する方法と同様にして、エンハンサー活性を有する領域を得ることができる。

メグー3遺伝子の発現を制御している転写因子は、「新細胞工学実験プロトコール（秀潤社）」、「バイオマニュアルシリーズ5 転写因子研究法（羊土社）」、「DNA & Cell Biology, 13, 731-742 (1994)」に記載の方法等の公知の方法、例えば、アフィニティーカラムを用いた方法、サウスウエスタン法、フットプリンティング法、ゲルシフト法、または one-hybrid 法で得ることができる。なお、本明細書において、転写因子とはメグー3遺伝子の転写を調節している因子で、転写の開始反応を誘導する転写開始因子と、転写を正または負に調節する転写調節因子をさす。

アフィニティーカラム法を用いる場合は、前述の方法で得た、プロモーター領域、エンハンサー領域をセファロース或いはラテックスビーズに固定化したカラムに、核抽出液をかけ、カラムを洗浄後、カラムに固定化した配列と同様の配列を有するDNAを用い、結合した転写因子を溶出することによって、メグー3遺伝子の発現を制御している転写因子を得ることができる。

また、サウスウエスタン法を用いる場合は、大腸菌の発現ベクター（例えば *λ*gt11）に挿入した cDNA の発現産物を標識プローブによってスクリーニングする。たとえばスクリーニングすべき cDNA を  $\beta$ -ガラクトシダーゼとの融合タンパク質として発現させ、これをニトロセルロース膜に吸着させる。次いで放射性同位元素で標識されたプロモーター領域やエンハンサー領域の DNA 断片をプローブにし、結合活性をもつ融合タンパク質を合成するファージを選択することによって、メグー 3 遺伝子の発現を制御している転写因子を得ることができる。

ゲルシフト法は、遊離の DNA がタンパク質と結合したときにポリアクリルアミドゲルによる電気泳動の移動度に差を生じる現象に基づいている。プロモーター領域やエンハンサー領域の DNA 断片をプローブとし、転写因子が含まれる試料（たとえば核蛋白質抽出液）と混合して、低イオン強度の元で電気泳動分析する。転写因子の結合は、遊離の DNA とは違った移動度のバンドとして検出される。ゲルシフト法は、タンパク質の混合物から高い感度で転写因子を分離することができる。

ゲルシフト法によって得られた DNA と転写因子の複合体を、更にフットプリント法によって解析すると、転写因子の結合部位を決定することができる。フットプリント法は、DNA 上にタンパク質が結合すると DNase I の消化から保護される現象を利用している。すなわち、末端を  $^{32}\text{P}$  で標識したプロモーター領域やエンハンサー領域の DNA を、転写因子の共存化で DNase I によって部分消化し、これを塩基配列決定用の変性ポリアクリルアミドゲルで分離する。転写因子の無い状態で同様の処理を行った結果と比較すると、転写因子の結合によってバンドの消失が観察されることから、その結合部位の推定が可能となる。

本発明はまた、メグー 3 を認識する抗体を提供する。本発明の抗体には、例えば、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質に対する抗体が含まれる。メグー 3 または本発明のメグー 3 の部分ペプチドに対する抗体（例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体）または抗血清は、本発明のメグー 3、

本発明のメグー 3 の部分ペプチド、あるいは本発明による c-myc-(His)<sub>6</sub>-Tag-メグー 3 や MBP-メグー 3 のような融合タンパク質を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

本発明のメグー 3、または本発明のメグー 3 の部分ペプチドは、温血動物に対して投与による抗体産生が可能な部位に、公知の担体や希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常 1~6 週毎に 1 回ずつ、計 2~10 回程度行われる。抗体産生に用いられる温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、あるいはニワトリ等が挙げられるが、マウスおよびウサギが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の 2~5 日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化メグー 3 と抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法 (Nature, 256, 495 (1975)) に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくは PEG が用いられる。

骨髓腫細胞としては例えば X-63Ag8、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1 などが挙げられるが、X-63Ag8 が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞 (脾臓細胞) 数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は 1:20~20:1 であり、PEG (好ましくは PEG1000~PEG6000) が 10~80% 程度の濃度で添加され、20~40℃、好ましくは 30~37℃ で 1~10 分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。抗メグー 3 抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えばメグー 3 抗原を直接又は担体と共に吸着させた固相 (例えば、マイク



ロプレート) にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体 (細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体) が用いられる。またはプロテイン A を加え、固相に結合した抗メグー 3 モノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体又はプロテイン A を吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したメグー 3 を加え、固相に結合した抗メグー 3 モノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

抗メグー 3 モノクローナル抗体の選別およびクローニングは、自体公知またはそれに準じる方法に従って行うことができる。通常 HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) を添加した動物細胞用培地で行われる。選別、クローニングおよび育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いてもよい。例えば、1~20%、好ましくは 10~20% の牛胎児血清を含む RPMI1640 培地 (大日本製薬 (株))、1~10% の牛胎児血清を含む GIT 培地 (和光純薬工業 (株))、またはハイブリドーマ培養用無血清培地 (SFM-101、日水製薬 (株)) などを用いることができる。培養温度は、通常 20~40℃、好ましくは約 37℃である。培養時間は、通常 5 日~3 週間、好ましくは 1 週間~2 週間である。培養は、通常 5% 炭酸ガス下で行われる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗メグー 3 抗体価の測定と同様にして測定できる。クローニングは、通常半固体アッガー法や限界希釈法などのそれ自体公知の方法で行うことができ、クローン化されたハイブリドーマは、好ましくは無血清培地中で培養され、至適量の抗体をその上清に与える。目的のモノクローナル抗体は腹水化して得ることもできる。

本発明によるモノクローナル抗体は、メグー 3 に特異的なエピトープを認識するものを選択することによって他のタンパク質と交差しないものとすることができる。一般的に、そのタンパク質を構成するアミノ酸配列の中から、連続する少なくとも 7 以上のアミノ酸残基、望ましくは 10-20 アミノ酸のアミノ酸配列によ

って提示されるエピトープは、そのタンパク質に固有のエピトープを示すといわれている。したがって、配列番号：2に記載されたアミノ酸配列から選択され、かつ連続する少なくとも7アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を持つペプチドによって構成されるエピトープを認識するモノクローナル抗体は、本発明におけるメグー3特異的なモノクローナル抗体といえる。

抗メグー3モノクローナル抗体の分離精製は通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法に従って行われる。公知の精製法としては、例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例えばDEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲル濾過法、抗原結合固相またはプロテインAまたはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法のような手法を示すことができる。

このようにして得られたメグー3を認識する本発明によるモノクローナル抗体、あるいはポリクローナル抗体は、メサンギウム細胞に関連する疾病の診断や治療に利用することが可能である。これらの抗体を用いてメグー3を測定する方法としては、不溶性担体に結合させた抗体と標識化抗体とによりメグー3を反応させて生成したサンドイッチ錯体を検出するサンドイッチ法、また、標識ヒト・メグー3と検体中のヒト由来メグー3を抗体と競合的に反応させ、抗体と反応した標識抗原量から検体中のヒト由来メグー3を測定する競合法等を示すことができる。

サンドイッチ法によるメグー3の測定においては、まず、固定化抗体とメグー3とを反応させた後、未反応物を洗浄によって完全に除去し、標識化抗体を添加して固定化抗体-メグー3標識化抗体を形成させる2ステップ法、もしくは固定化抗体、標識化抗体およびメグー3を同時に混合する1ステップ法などを用いることができる。

測定に使用される不溶性担体は、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリル酸エステル、ナイロン、ポリアセタール、フッ素樹脂等の合成樹脂、セルロース、アガロース等の多糖類、

ガラス、金属などが挙げられる。不溶性担体の形状としては、例えばトレイ状、球状、粒子状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管等の種々の形状を用いることができる。抗体を吸着した担体は、適宜アジ化ナトリウム等の防腐剤の存在下、冷所に保存する。

抗体の固相化は、公知の化学結合法又は物理的吸着法を用いることができる。化学的結合法としては例えばグルタルアルデヒドを用いる方法、N-スクシニイミジル-4- (N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシレート及びN-スクシニイミジル-2-マレイミドアセテートなどを用いるマレイミド法、1-エチル-3- (3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸などを用いるカルボジイミド法が挙げられる。その他、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル法、N-サクシミジル-3- (2-ピリジルジチオ) プロピオン酸法、ビスジアゾ化ベンジジン法、ジパルミチルリジン法が挙げられる。あるいは、先に被検出物質とエピトープの異なる2種類の抗体を反応させて形成させた複合体を、抗体に対する第3の抗体を上記の方法で固相化させておいて捕捉することも可能である。

標識物質は、免疫学的測定法に使用することができるものであれば特に限定されない。具体的には、酵素、蛍光物質、発光物質、放射性物質、金属キレート等を使用することができる。好ましい標識酵素としては、例えばペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ-5-ステロイドイソメラーゼ、 $\alpha$ -グリセロールホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、西洋わさびパーオキシダーゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、およびアセチルコリンエステラーゼ等が挙げられる。好ましい蛍光物質としては、例えばフルオレセインイソチアネート、フィコビリプロテイン、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、およびオルトフタルアルデヒド等が挙げられる。好ましい発光物質として

はイソルミノール、ルシゲニン、ルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩及びその修飾エステル、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、およびエクオリン等が挙げられる。そして好ましい放射性物質としては、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{127}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、あるいは $^{35}\text{S}$ 等が挙げられる。

前記標識物質を抗体に結合する手法は公知である。具体的には、直接標識と間接標識が利用できる。直接標識としては、架橋剤によって抗体、あるいは抗体断片と標識とを化学的に共有結合する方法が一般的である。架橋剤としては、N,N'-オルトフェニレンジマレイミド、4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、6-マレイミドヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、4,4'-ジチオピリジン、その他公知の架橋剤を利用することができる。これらの架橋剤と酵素および抗体との反応は、それぞれの架橋剤の性質に応じて既知の方法に従って行えばよい。この他、抗体にビオチン、ジニトロフェニル、ピリドキサル又はフルオレサミンのような低分子ハプテンを結合させておき、これを認識する結合成分によって間接的に標識する方法を採用することもできる。ビオチンに対してはアビジンやストレプトアビジンが認識リガンドとして利用される。一方、ジニトロフェニル、ピリドキサル又はフルオレサミンについては、これらのハプテンを認識する抗体が標識される。抗体を標識する場合、西洋わさびペルオキシダーゼを標識化酵素として用いることができる。本酵素は多くの基質と反応することができ、過ヨウ素酸法によって容易に抗体に結合させることができるので有利である。また、抗体としては場合によっては、そのフラグメント、例えばFab'、Fab、F(ab')<sub>2</sub>を用いる。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体にかかわらず同様の処理により酵素標識体を得ることができる。上記架橋剤を用いて得られる酵素標識体はアフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法にて精製すれば更に感度の高い免疫測定系が可能となる。精製した酵素標識化抗体は、防腐剤としてチメロサル(Thimerosal)等を、そして安定剤としてグリセリン等を加えて保存する。標識抗体は、凍結乾燥して冷暗所に保存すること

により、より長期にわたって保存することができる。

標識化剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤が用いられる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質溶液として  $H_2O_2$  を用い、発色剤として 2,2'-アジノ-ジ-[3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸]アンモニウム塩 (ABTS)、5-アミノサリチル酸、オルトフェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン等を使用することができる。酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合は、基質としてオルトニトロフェニルフォスフェート、パラニトロフェニルリン酸等を使用することができる。酵素に  $\beta$ -D-ガラクトシダーゼを用いる場合は基質としてフルオレセイン-ジ- ( $\beta$ -D-ガラクトピラノシド)、4-メチルウンベリフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド等を使用することができる。本発明は、また、前述のモノクローナル抗体、あるいはポリクローナル抗体を標識して、あるいは固相化してメグー 3 の免疫学的測定用試薬としたもの、更にはこの試薬に標識検出用の指示薬や対照試料等をキット化したものをも含むものである。

本発明におけるメグー 3 の測定対象は、血漿、血清、血液、尿、組織液、あるいは脳脊髄液等の体液等、メグー 3、あるいはメグー 3 の前駆体や断片を含む生体試料であれば限定されない。

加えて本発明は、メグー 3 遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物に関する。ここでメグー 3 遺伝子とは、メグー 3 をコードする cDNA、ゲノム DNA あるいは合成 DNA を含む。また、遺伝子の発現には、転写と翻訳のいずれのステップも含まれる。本発明によるトランスジェニック動物は、メグー 3 の機能あるいは発現調節の研究、ヒトのメサングウム細胞に関連する疾患のメカニズムの解明、医薬品のスクリーニング・安全性に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

本発明においては、メグー 3 遺伝子の発現を正常に調節しているいくつかの重要な部位 (エンハンサー、プロモーター、イントロン等) の一部に欠失、置換、

挿入などの変異を起こさせることにより、本来の遺伝子の発現レベルと比較して人工的に上昇または下降するように修飾することができる。このような修飾は、メグー 3 遺伝子の転写の調節である。一方、エキソンの一部を欠損させたり、翻訳領域への点突然変異の導入により終止コドンへ置換することにより、タンパク質への翻訳を修飾することもできる。この変異の導入は、公知の方法により行うことができ、トランスジェニック動物を得ることができる。

トランスジェニック動物とは狭義には遺伝子組換えにより、外来遺伝子が生殖細胞に人為的に導入された動物のことをいい、広義にはアンチセンス RNA を用いて特定の遺伝子の機能を抑えたアンチセンス・トランスジェニック動物や、胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いて特定の遺伝子をノックアウトさせた動物、点突然変異 DNA を導入した動物を含み、個体発生の初期に外来遺伝子が安定して染色体に導入され、その子孫に遺伝形質として伝達され得る動物のことをいう。本明細書でいうトランスジェニック動物とはヒト以外のすべての脊椎動物を含む。

トランスジェニック動物の作製方法は、遺伝子と卵を混合させてリン酸カルシウムで処理する方法や、位相差顕微鏡下で前核期卵の核に、微小ピペットで遺伝子を直接導入する方法 (マイクロインジェクション法、米国特許第 4873191 号)、胚性幹細胞 (ES 細胞) を使用する方法などがある。その他、レトロウィルスベクターに遺伝子を挿入し、卵に感染させる方法、また、精子を介して遺伝子を卵に導入する精子ベクター法等が開発されている。精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレーション等の方法で精子細胞内に取り込ませた後に、卵子に受精させることにより、外来遺伝子を導入する遺伝子組換え法である (M. Lavitrano et al. *Cell*, 57, 717, 1989)。

あるいはバクテリオファージ P1 の cre/loxP リコンビナーゼ系や *Saccharomyces cerevisiae* の FLP リコンビナーゼ系等の *in vivo* において部位特異的遺伝子組み換えを用いることもできる。また、レトロウィルスを使用して、非ヒト動物へ目的タンパク質のトランスジーンを導入する方法も報告されている。

マイクロインジェクション法によるトランスジェニック動物作製方法は、例えば以下に示すようにして行われる。まず、発現制御に関わるプロモーター、特定のタンパク質をコードする遺伝子、ポリ A シグナルから基本的に構成されるトランスジーンが必要である。プロモーター活性により特定分子の発現様式や発現量が左右され、また、導入トランスジーンのコピー数や染色体上の導入部位により作製されたトランスジェニック動物は系統間で異なるため、各系統間で発現様式・発現量を確認する。非翻訳領域やスプライシングにより発現量が変化することが判明しているため、予めポリ A シグナルの前にスプライシングされるイントロン配列を導入してもよい。受精卵に導入する遺伝子はできるだけ純度の高いものを使用することが重要である。使用する動物としては、受精卵採取用マウス（5～6 週齢）、交配用雄マウス、偽妊娠雌マウス、輸精管結紮雄マウス等が用いられる。

効率よく受精卵を得るために、ゴナドトロピン等により排卵を誘発してもよい。受精卵を回収し、マイクロインジェクション法にて卵の雄性前核にインジェクションピペット中の遺伝子を注入する。注入した卵を輸卵管に戻すための動物（偽妊娠雌マウス等）を用意し、一匹に対して約 10～15 個を移植する。その後、誕生したマウスにトランスジーンが導入されているか否か、尾の先端部からゲノム DNA を抽出し、サザン法あるいは PCR 法によりトランスジーンを検出するか、あるいは相同組み換えが起こったときのみに活性化するマーカー遺伝子を挿入したポジティブクローニング法により選択することができる。さらに、トランスジーンが発現を確認するため、ノザン法もしくは RT-PCR 法によりトランスジーン由来転写産物を検出する。または、タンパク質に対する特異的抗体によって、ウェスタンブロッティング法による検出も可能である。

本発明のノックアウトマウスは、マウスメグ 3 遺伝子の機能が失われるように処理されたものである。ノックアウトマウスとは相同組換え技術で任意の遺伝子を破壊し、機能を欠損させたトランスジェニックマウスをいう。胚性幹細胞を

用いて相同組換えを行い、一方の対立遺伝子を改変・破壊した胚性幹細胞を選別し、ノックアウトマウスを作製することができる。例えば、受精卵の胚盤胞や8細胞期胚に遺伝子を操作した胚性幹細胞を注入して、胚性幹細胞由来の細胞と胚由来の細胞が混ざったキメラマウスを得る。このキメラマウス（キメラとは、2個以上の受精卵に基づいた体細胞で形成される単一個体をいう）と正常マウスを交配すると、一方の対立遺伝子の全てが改変・破壊されたヘテロ接合体マウスを作製することができる。さらに、ヘテロ接合体マウス同士を交配することで、ホモ接合体マウスが作製できる。本発明によるトランスジェニック動物は、これらヘテロ接合体と、ホモ接合体のいずれをも含むものである。

相同組換えとは、遺伝子組換え機構で塩基配列が同じ、または非常に類似している2つの遺伝子間で起こる組換えのことをいう。相同組換えを起こした細胞の選別にはPCRを使用することができる。挿入遺伝子の一部と挿入が期待される領域の一部をプライマーとして使ったPCR反応を行い、増幅産物ができた細胞で相同組換えを起こしていることが判明する。また、胚幹細胞で発現している遺伝子に相同組み換えを起こさせる場合には、導入遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を結合させておき、導入後に細胞をネオマイシン耐性にさせることにより選択することができる等、公知の方法およびそれらの変法を用いて容易に選択することができる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、抗メグー3抗体によるウエスタンブロット解析の結果を示す写真である。各レーンは、次の抗原に対応している。

レーン1：MBP

レーン2：MBP-メグー3

レーン3：ウサギ網状赤血球を用いて *in vitro* transcription and translation にて発現させたルシフェラーゼ蛋白（Promega）



レーン 4 : 3 末端 c-myc 付加メグー 3

図 2 は、3 末端 c-myc 付加メグー 3 を高発現させた CHO 細胞の、共焦点レーザー顕微鏡による検鏡結果を示す写真である。中央で青色に染色されているのが核を、その周囲で緑色に蛍光染色されている部分がメグー 3 の局在を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下本発明を実施例として更に具体的に説明するが、本発明は該実施例に限定されるものではない。

##### 〔実施例 1〕 ヒトメサングウム細胞の初代培養

58 才の男性から摘出した正常なヒト腎臓から、ヒト糸球体腎臓メサングウム細胞を単離した。腎皮質を、無菌条件下で分離し、細分化し、いくつかの篩を通過させた。用いる篩は、段階的に孔径を小さくしていった。75~200  $\mu\text{m}$  の孔径の篩に捕捉された糸球体を、洗浄し、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のコラゲナーゼ (Washington Biochemical 社製) と共に 37℃ で 20 分間インキュベートした。洗浄後、糸球体を、25mM HEPES、10% Nu-serum (Collaborative Biomedical Products 社, Bedford, MA) および抗生物質 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のペニシリン、ストレプトマイシン、およびファンギゾン) を含む培地 199 (Gibco BRL 社, Gaithersburg, MD) に再懸濁させ、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内でインキュベートした。3 継代目に、メサングウム細胞を、典型的な形態学的特徴、トリプシン、ピューロマイシンおよび D-バリンに対する耐性、アクチン (Zymed Laboratories 社, San Francisco, CA)、抗 VLA (very late antigen)-1, 3, 5 (Immunotech) の免疫染色に対して陽性を示すこと、ならびに第 VIII 因子 (Dako 社, CA) の免疫染色に陰性を示すことなどの一連の基準により同定した。

##### 〔実施例 2〕 ヒト培養メサングウム細胞からの mRNA の単離

6 継代目に、グアニジンイソチオシアネート (GTC) 法を用いて、全 RNA をヒトメサングウム細胞から単離した。即ち、実施例 1 の細胞の血清を含む培養液中の

メサンギウム細胞コンフルエント培養物をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、5.5mM GTC 溶液中で溶解させた。DNA は 18 ゲージの針を通過させることにより除去した。核およびその他の細胞破片は  $5,000 \times g$  で 90 秒間遠心分離することにより沈殿させた。上清をセシウムトリフルオロアセテート (CsTFA) 層に注意深く載せ、 $15^{\circ}\text{C}$ 、 $125,000 \times g$  で 24 時間遠心分離した。RNA ペレットを TE バッファーに溶解させた。オリゴ dT セルロースカラム (ファルマシア社) により、poly(A)<sup>+</sup>RNA を分離した。

#### [実施例 3] 3' 領域 cDNA ライブラリーの構築

poly(A)<sup>+</sup>RNA を鋳型として、pUC19 を基礎とするベクタープライマー [Norrander J., et al., Gene, 26, 101-106 (1983)] を用いた cDNA 合成を行った。このベクタープライマー DNA は、HincII 末端、および T テールをもつ PstI 末端を有し、MboI 部位 (GATC) でダム・メチル化 (dam-methylated) されていた。第 2 鎖の合成の後、cDNA 配列、およびベクターの lacZ 遺伝子内の単一 BamHI 部位を、それぞれ MboI および BamHI で切断し、次に、低 DNA 濃度で環状化およびライゲーションを行った。ライゲーション混合物のうちの一部を大腸菌に形質転換した。得られた形質転換体をランダムに選択し、簡単に加熱することにより個別に溶解させた。cDNA 挿入配列を、pUC19 クローニングサイトに隣接するプライマー (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3' / 配列番号: 3 および 5'-ACCATGATTACGCCAAGCTTG-3' / 配列番号: 4) を用いたペアード PCR により増幅させた。得られた短い二本鎖 DNA を、サイクル配列決定反応に用い、自動配列決定機で解析した。

#### [実施例 4] メサンギウム細胞で特異的に発現している遺伝子の単離

メサンギウム細胞で特異的に発現している遺伝子を同定するため、本発明者は、大規模な DNA 配列決定およびコンピュータによるデータ処理を行った。このことにより、様々な異なる細胞および臓器における転写産物を同時に比較することができた (Y. Yasuda et al., Kidney International 53:154-158, 1998; K. Matsubara et al., Gene. 135, 265 (1993); K. Okubo et al., Nat. Gen. 2, 173 (1992))。

ヒト培養メサンギウム細胞の 3' 領域 cDNA ライブラリーの大規模 DNA 配列決定を行い、ランダムに選択した 1836 個のクローンの部分配列を決定した。クローンの配列相同性を、相互に比較し、さらに FASTA プログラムを用いて DNA データバンク GenBank と比較した。様々な臓器および細胞からの mRNA をドットプロット解析することにより、メサンギウム細胞で特異的に発現しているクローンが選択された。その結果、本発明者のメサンギウム細胞 cDNA ライブラリーにおいてきわめて高い頻度で検出されるいくつかのクローンが得られた。

〔実施例 5〕 ヒト・メサンギウム細胞  $\lambda$  ZIPLox cDNA ライブラリーのスクリーニング

実施例 2 にしたがって調製した全 mRNA から、オリゴ dT プライマーとランダムプライマーとを用いて  $\lambda$  ZIPLox cDNA ライブラリーを合成した。ライブラリーの合成には市販の  $\lambda$  zip lox (Gibco BRL 社製、商品名  $\lambda$  ZIPLox EcoRI Arms) を利用した。実施例 4 で得たメサンギウム細胞 cDNA ライブラリーで特に高頻度に検出される特定のクローンについて、そのインサートをプローブとして、この  $\lambda$  ZIPLox cDNA ライブラリーをスクリーニングした。ポジティブクローンについて、挿入された遺伝子断片の塩基配列をジデオキシターミネーション法により決定した。

予想される開始コドン ATG の位置が、コンセンサス配列と一致し、最長のオープンリーディングフレーム (「the first ATG rule」を満足する) を与えた。メグー 3 cDNA の塩基配列を配列番号: 1 に、メグー 3 の推定アミノ酸配列を配列番号: 2 に示す。

〔実施例 6〕 メサンギウム特異的遺伝子の機能解析 (1)

SwissProt データベースで FASTA プログラムによりアミノ酸ホモロジー検索を行ったところ、高い相同性を持った公知のアミノ酸配列はなく、メグー 3 が新規なタンパク質であることを確認した。

続いてメグー 3 のアミノ酸配列をモチーフ検索した。検索には、PSORT WWW Server (<http://psort.nibb.ac.jp:8800/>) を利用した。その結果、N 末端から数え

て500番目以降の領域において、proline rich protein と呼ばれる多くのタンパク質と良く似たアミノ酸配列が見出された。特に621番目～701番目に至る81アミノ酸残基からなる領域は、プロリンに富み(27.2%)、SH3(Src homology 3)ドメインに結合する proline rich ペプチド (PR ペプチド) のアミノ酸配列(xPxxPPPFxP)に類似するアミノ酸配列(xPESPPPAxP)を2ヶ所に有する。その他、メグー3には次に示すようなリン酸化酵素によるリン酸化モチーフの存在が確認された。また2つのN-ミリスチル化部位が認められた。更に推測される細胞質局在は52.2%であった。これらの事実は、メグー3がシグナル伝達因子であることを強く示唆する。

カゼイン・カイネース II リン酸化部位：14

プロテインカイネースCリン酸化部位：9

チロシンカイネースリン酸化部位：1

また、これらの事実に基づいて、733アミノ酸残基からなる上記推定アミノ酸配列がメグー3のアミノ酸配列であることが確認された。このアミノ酸配列からなるタンパク質の、計算上の分子量は約83kDa、pIの理論値は5.72である。

#### [実施例7] メグー3の機能解析(2) - 組織分布

メグー3のノーザンブロット解析は、以下のようにして行った。3'領域 cDNA ライブラリー(実施例3)のポジティブクローンのインサートを、ランダム DNA ラベリングによってRI標識しプローブとして用いた。試料として以下の細胞から単離した poly(A)<sup>+</sup>RNA (2μg) を、2.2Mホルムアミドを含む1%アガロースゲルで分離し、ニトロセルロースフィルターへ転写した。フィルターをRapid Hyb 溶液(Amersham 社, Arlington Heights, IL)中でハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ後に、60℃で、0.1×SSPE/0.1%SDS という最終ストリンジェンシーで洗浄した。

ヒトの複数の初代培養細胞および組織のノーザンブロット、ヒトの癌細胞株の

ノーザンブロットのための試料は、Clontech (Palo Alto, CA) から購入した。初代培養細胞としては、ヒトメサングウム細胞、ヒト皮膚繊維芽細胞、ヒト腎皮質上皮細胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞、およびヒト平滑筋細胞の初代培養細胞由来の  $2\mu\text{g}$  の poly(A)<sup>+</sup>RNA を試料とした。ヒトの癌細胞株のノーザンブロットには、前骨髄球白血病 HL-60、HeLa 細胞 S3、慢性骨髄性白血病 K-562、リンパ芽球白血病 MOLT-4、Burkitt リンパ腫 Raji、大腸腺癌 SW480、肺癌 A549、および黒色腫 G361 由来の  $2\mu\text{g}$  の poly(A)<sup>+</sup>RNA を試料とした。組織のノーザンブロットには、心、脳、胎盤、肺、肝、骨格筋、腎、および脾由来の  $2\mu\text{g}$  の poly(A)<sup>+</sup>RNA を試料とした。ハイブリダイゼーションおよび洗浄は上記と同様にして行った。結果は表 1 - 3 に示すとおりである。

表 1

初代培養細胞	
ヒトメサングウム細胞	+++
ヒト皮膚繊維芽細胞	++
ヒト腎皮質上皮細胞	++
ヒト臍帯静脈内皮細胞	±
ヒト平滑筋細胞	±

表 2

ヒト癌細胞株	
前骨髄球白血病 HL-60	—
HeLa 細胞 S3	+++
慢性骨髄性白血病 K-562	+
リンパ芽球白血病 MOLT-4	—
Burkitt リンパ腫 Raji	—
大腸腺癌 SW480	+++
肺癌 A549	++
黒色腫 G361	+

表 3

ヒト組織	
心	+
脳	—
胎盤	+++
肺	+
肝	±
骨格筋	±
腎	+
脾	++

メグー 3 cDNA プローブを用いたノーザンブロット解析で、メサングウム培養細胞に単一の転写産物（約 4.0kb）が検出された。ヒトの初代培養細胞においては、メグー 3 遺伝子がメサングウム細胞で特に高度に発現していることが特徴的であった。その他の初代培養細胞では、腎皮質上皮細胞や皮膚繊維芽細胞で発現が観察され、ヒトの臍帯静脈内皮細胞や平滑筋細胞においてはわずかな発現が観察された。組織間の比較においては、ヒトの胎盤、次いで脾で高度な発現が観察された。その他に、心、肺、あるいは腎等の組織で発現が観察され、肝と骨格筋においては発現が弱く、脳での発現は検出できなかった。培養癌細胞株においては HeLa 細胞 S3 と大腸腺癌 SW480 で強い発現が、また肺癌 A549 でも発現が見られたが、その他の細胞株では顕著な発現は観察されなかった。

#### [実施例 8] メグー 3 の機能解析 (3) —インサイチュハイブリダイゼーション

インサイチュハイブリダイゼーション (in situ hybridization、以下 ISH と省略する) により、ヒト正常腎組織で、メグー 3 mRNA 発現を評価した。ISH は、公知の方法により行った (Kidney Int. 52, 111 (1997))。ヒト・メグー 3 cDNA の 404-433 位の塩基配列 (配列番号: 5) をプローブとして用いた。糸球体内で、メグー 3 転写産物はメサングウム細胞に局在化していた。シグナルの特異性を評価するため、ハイブリダイゼーションの前に RNase で組織を前処理すると、メグー 3 プローブで検出されるシグナルの大部分が除去された。また、100 倍過剰の

同種または無関係の未標識オリゴヌクレオチドで競合実験を行ったところ、メグー 3 のプローブに由来するシグナルは、同じ塩基配列を持つオリゴヌクレオチドでは消失したが、非同種オリゴヌクレオチドでは消失しなかった。これらの結果から、配列番号：1 に示した塩基配列を持つメグー 3 遺伝子は、メサングウム細胞で特異的に発現していることが確認できた。

#### [実施例 9] メグー 3 蛋白質の発現

メグー 3 の翻訳領域を含む遺伝子を得るために、ヒト培養メサングウム細胞 poly(A)<sup>+</sup>RNA (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l) 1.0  $\mu$ l を鋳型とし、翻訳領域をコードするように設計したプライマー、すなわち、開始コドンを含み 5' 端に制限酵素 EcoRI 認識配列を加えたプライマー (5'-CGGAATTCATGGGGTGGATGGG-3'/配列番号：6) 及びストップコドンと EcoRI 認識配列を加えたプライマー (5'-GCGAATTCTAGAACTCAGTCTGCACCCCTGC-3'/配列番号：7) で PCR 反応をおこなった。反応条件は、10 $\times$ Ex Taq バッファー 5  $\mu$ l、dNTP 混合物 (2.5mM) 8  $\mu$ l、PCR プライマー (配列番号：6、20pmol/ $\mu$ l) 0.5  $\mu$ l、一次 PCR A1 プライマー (配列番号：7、20pmol/ $\mu$ l) 0.5  $\mu$ l、T aKaRa Ex TaqTM (10U/ $\mu$ l) 0.5  $\mu$ l、滅菌水で全量を 50  $\mu$ l とした。「Takara PCR Thermal Cycler」にセットし、94 $^{\circ}$ C 1 分、60 $^{\circ}$ C 2 分、72 $^{\circ}$ C 2 分を 30 サイクル反応させた。0.75% アガロースゲル電気泳動法でバンドが得られていることを確認し、反応溶液夜中から 1  $\mu$ l を「Original TA Cloning Kit」(Invitrogen 社) を用いてサブクローニングし、得られたプラスミドを meg3/pCR2 とした。このプラスミドを EcoRI で切断し、EcoRI で切断したマルトース結合蛋白質融合蛋白質発現用ベクター、pMAL-c2 (New England Biolab 社) と、T4 リガーゼを用い結合し、大腸菌 JM 109 を形質転換した。18 時間後、アンピシリン耐性株を 3ml の LB 培養液に植え、18 時間培養後、ミニプレ法によりプラスミドを抽出し、制限酵素で確認し、発現ベクター、pMALc2/meg3 を得た。

pMALc2/meg3 で形質転換した大腸菌 XL1-Blue を 100  $\mu$ g/ml になるようにアンピシリンを加えた 10ml の LB 培地で 37 $^{\circ}$ C、18 時間振とう培養し、この培養液を

11 の Rich 培地 (1 L 中に 10g トリプトン、5g 酵母抽出物、5g NaCl、2g グルコースを含みアンピシリンを  $100 \mu\text{g/ml}$  になるように加えたもの) に加え  $37^\circ\text{C}$  で振とう培養した。濁度計にて約 0.8 OD (A600) になったところで 0.1M IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside 1.41g を水 50ml に溶解したもの) 3ml を加え、続けて  $37^\circ\text{C}$  で振とう培養した。2 時間後、遠心操作 ( $4000\text{g} \times 20$  分) により菌体を集め、50ml の溶解バッファー (10mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、30mM NaCl、0.25% Tween20, pH7.0) を加えた。よく懸濁し、 $-80^\circ\text{C}$  で 18 時間凍結後、ソニケーション (BRANSON 社: SONIFIER250) し、菌体を粉碎した。0.5M になるように NaCl を加え、遠心操作 ( $10000\text{g} \times 30$  分) により上清を集めた。上清に 200ml の 0.25% Tween20/カラムバッファーを加え、あらかじめ 0.25% Tween20/カラムバッファー (0.25% Tween20、10mM リン酸、0.5M NaCl, pH7.2) で平衡化したアミロース樹脂 30ml を充填したカラムにロードした。1ml/分の流速で、100ml の 0.25% Tween20/カラムバッファー、次に 150ml のカラムバッファーで洗った後、マルトースを 10mM になるように加えたカラムバッファー、50ml でアミロース樹脂に結合した融合蛋白質を溶出した。これを限外濾過器 (Amicon stirred-cell concentrator) で約 1mg/ml まで濃縮し濃縮融合蛋白質 MBP-メグー 3 とした。

融合しているマルトース結合蛋白質は以下の方法で酵素により切断除去できる。蛋白質溶液を透析チューブ (分画分子量 3,500) に入れファクター Xa バッファー (20mM Tris·Cl、100mM NaCl、2mM  $\text{CaCl}_2$ 、1mM アジ化ナトリウム) に対して透析する。透析した溶液  $200 \mu\text{l}$  (1mg/ml) に  $10 \mu\text{l}$  のファクター Xa ( $200 \mu\text{g/ml}$ ) を加え、24 時間、室温で反応することにより、マルトース結合蛋白質と目的とする蛋白質との結合部位を特異的に切断する。切断後、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィーなどで精製をおこなうことにより目的とする蛋白質が得られる。

〔実施例 10〕 MBP-メグー 3 に対するポリクローナル抗体の製造

実施例 9 で得られた濃縮融合蛋白質 MBP-メグー 3 (10mM リン酸ナトリウム、



0.5M NaCl、10mM マルトース) を等量のフロインド完全アジュバントと混合し、充分乳化した。この乳液0.5ml を、ニュージーランドホワイトウサギ(雌、約4000g)の皮下に投与した(20 $\mu$ g/匹)。1回目免疫後、フロインド不完全アジュバントと混合したMBP-メグー3で、3週間後(50 $\mu$ g/匹)、5週間後(50 $\mu$ g/匹)、7週間後(50 $\mu$ g/匹)、9週間後(100 $\mu$ g/匹)、11週間後(200 $\mu$ g/匹)に追加免疫した。3回目の免疫後、1週間後に試験採血を行い、抗体価を測定した結果、204800倍に上昇していることを確認した。抗体価の測定は、抗原50ng/ウェルを固相化した96穴プレートを用いたEIAによって行った。連続的に希釈した抗血清を各ウェルに100 $\mu$ l づつ加えて一次反応を行い、上清除去、洗浄後、抗ウサギIgG Fab'-HRP (IBL、日本)を反応させ、洗浄後、OPD (Sigma, USA)で発色して測定した。また、得られた抗血清は、ウェスタンブロットにより、MBP-メグー3と特異的に反応することを確認した。

〔実施例11〕 ウサギポリクローナル抗MBP-メグー3 IgGの反応性の検討  
MBP-メグー3、3末端c-myc付加メグー3、並びにMBP単独発現大腸菌破碎液を抗原として用い、MBP-メグー3を免疫原とするウサギIgGの反応性を確認した。

MBP-メグー3には、pMALc2/meg3で形質転換した大腸菌JM109の細胞破壊液を用いた。また3末端c-myc付加メグー3の発現には、アンチセンスプライマーとしてPCR A1プライマーに代えてストップコドンを除いてEcoRI認識配列を加えたプライマー(5'-GCCAATTCGAACTCAGTCTGCACCCCTGC-3'/配列番号:8)を用い、実施例9と同様の操作で合成した断片を用いた。この断片を、EcoRIで消化したほ乳類細胞発現用pcDNA3.1 (Invitrogen)に挿入し、プラスミドとウサギ網状赤血球を用いてin vitro transcription and translation (Promega)によって発現させてc-myc付加メグー3とした。

それぞれのタンパク質溶液を等量のサンプルバッファー(0.25% トリス-HCl、2% SDS、30% グリセリン、10%  $\beta$ -メルカプトエタノール、0.

0.25%ブロモフェノールブルー) (第一化学薬品製) で処理し、5分間95℃で加熱して試料とした。得られた試料を、ゲル濃度4-20%のグラジエントゲル(第一化学薬品製) を用いてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE) (Laemmli, U.K., Nature, 第227巻, 680-685頁, 1970年) により分離した。

SDS-PAGEで分離したタンパク質を、ブロッティング溶液(25mM トリス-HCl、192mM グリシン、20%メタノール、pH8.3) を用いて100Vの定電圧で1時間、ポリビニリデンジフルオリド(PVDF) 膜(バイオ・ラッド製) にブロッティングした。ブロッティングしたPVDF膜を蒸留水で洗浄後、5%ブロックエースのTTBS溶液中で3時間ブロッキングした。次に、PVDF膜をTTBS(20mM トリス、500mM のNaCl、0.05% Tween 20、pH7.5) で洗浄した後、TTBSで希釈した1次抗体であるウサギポリクローナル抗MBP-メグー3 IgGの溶液と4℃で一夜反応させた。次に、アンプリファイドアルカリフォスファターゼイミュンブロットキット(バイオ・ラッド製) を用いて検出した。すなわち、TTBSで希釈したビオチン標識ヤギ抗ウサギIgGと室温で1時間インキュベートした後、あらかじめ室温でストレプトアビジンとビオチン標識アルカリフォスファターゼを1時間インキュベートして調製したストレプトアビジン-ビオチン標識アルカリフォスファターゼのコンプレックスを反応させた。PVDF膜をTTBSで洗浄し、基質(nitro blue tetrazolium と 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, p-toluidine 塩の溶液) と室温で約30分間インキュベートすることにより、1次抗体に結合された抗体を可視化した。蒸留水で十分反応させることにより、反応を停止させた。

結果を図1に示した。実施例10で得た本発明によるMBP-メグー3に対するポリクローナル抗体で、MBP-メグー3に相当するバンドが確認できた。したがってこのポリクローナル抗体は、メグー3を特異的に認識する抗体であることが示された。

### 〔実施例 1 2〕 メグー 3 の細胞内局在

EcoR I 断片メグー 3 の ORF フラグメントを挿入した前記 pcDNA3.1 を CHO に形質転換し、3 末端 c-myc 付加メグー 3 を高発現させた。その 2 日後の細胞を 4% パラホルムアルデヒド、0.5% Triton X-100 で固定し、抗マウス c-myc 抗体と反応させ、FITC 標識抗マウス抗体を反応させた。更にヘキスト 33341 で核染色し、共焦点レーザー顕微鏡で検鏡した。

結果は図 2 に示した。アミノ酸配列の解析で推測されたとおりメグー 3 は細胞質に局在することが確認された。

### 産業上の利用の可能性

本発明により、メサンギウム細胞に高頻度に発現している DNA と、この DNA がコードするタンパク質等が提供された。これらはメサンギウム細胞に特異的な生理活性に深く関与していると推測され、メサンギウム細胞の同定、メサンギウム細胞の異常の検出などに有用である。更に、該タンパク質の機能からメサンギウム細胞の機能が明らかになり、メサンギウム細胞に関連する疾患の原因究明への展開が期待される。また、メサンギウム細胞に関連する疾病の治療、診断等への応用が期待される。

具体的には、たとえばメグー 3 の人為的な調節によって、糸球体腎炎の発症や進展を制御できる可能性がある。あるいはメサンギウム細胞や体液中のメグー 3 タンパク質や mRNA の定量によって、糸球体腎炎などの腎疾患の診断が可能となることが期待できる。糸球体腎炎ではメサンギウム領域の機能異常が見られ、メサンギウム細胞の増殖、あるいは細胞からのマトリックス基質の産生亢進が起きている。これらの病態にメグー 3 が関与している可能性は十分に考えられる。

本発明によるメグー 3 は、メサンギウム細胞で高度に発現しているという点では、本発明者が先に報告したメグシンと共通の特徴を備えている。しかしながら本発明によるメグー 3 は proline rich ドメインを有する細胞内シグナル伝達系物

質である可能性が示唆されるのに対して、メグシンはプロテアーゼインヒビターである SERPIN スーパーファミリーとの相同性を持つタンパク質である。また本発明によるメグー 3 が比較的広範囲な組織において発現が観察されている点は、メグシンのメサンギウム細胞に特異的に発現しているという特徴と相違する。したがって本発明によるメグー 3 は、メサンギウム細胞の機能を支える重要なタンパク質である可能性を持っている。このような重要なタンパク質の存在を明らかにした本発明の意義は大きい。

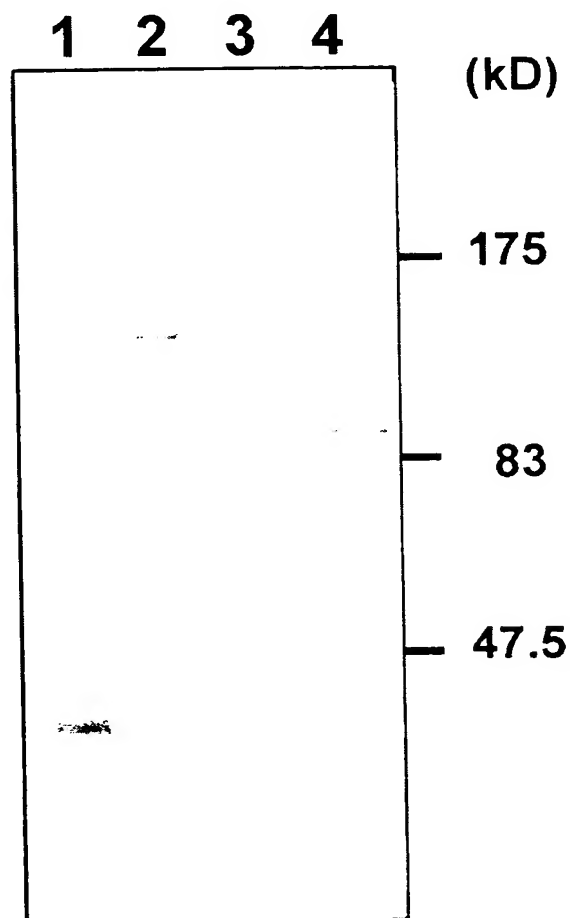
## 請求の範囲

1. 配列番号：2に記載のアミノ酸配列、またはこれらアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列を含み、このアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質。
2. 配列番号：2のアミノ酸配列を含む請求項1のタンパク質。
3. 請求項1に記載のタンパク質をコードするDNA。
4. 配列番号：1の塩基配列を含む請求項3記載のDNA。
5. 配列番号：1の塩基配列を持つDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、請求項1に記載のタンパク質またはこれらタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNA。
6. 請求項4に記載のDNAと特異的にハイブリダイズするDNAであって、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を持つDNA。
7. 請求項4に記載のDNAもしくはその一部に対するアンチセンスDNA。
8. 請求項3、請求項4、および請求項5のいずれかに記載のDNAを含むことを特徴とするベクター。
9. 請求項3、請求項4、および請求項5のいずれかに記載のDNAを発現可能に保持する形質転換細胞。
10. 請求項9に記載の形質転換細胞を培養し、請求項3、請求項4、および請求項5のいずれかに記載のDNAの発現産物を回収することを特徴とする、請求項1に記載のタンパク質の製造方法。
11. 請求項6のDNAを含むメサンギウム細胞の検出用試薬。
12. 請求項1に記載のタンパク質に結合することを特徴とする抗体。
13. 配列番号：2のアミノ酸配列から選択されたアミノ酸配列を持つタンパク質の一部を認識する請求項12の抗体。

14. 抗体がモノクローナル抗体である請求項13の抗体。
15. 請求項13または請求項14のいずれかに記載の抗体と請求項2のタンパク質、またはその断片との免疫学的な結合に基づいて請求項2のタンパク質またはその断片を測定する免疫学的測定方法。
16. 請求項12～請求項14のいずれかに記載の抗体を含む、メサングウム細胞の検出用試薬。
17. 生体試料中に含まれる請求項2のタンパク質またはその断片を測定し、正常試料から得られた測定値と比較することによってメサングウム増殖性腎症を検出する方法。
18. メグー3をコードする遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物。
19. 非ヒト脊椎動物がマウスである請求項18のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。
20. メグー3をコードする遺伝子の発現が抑制されたノックアウトマウスである請求項19のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

1 / 2

図 1

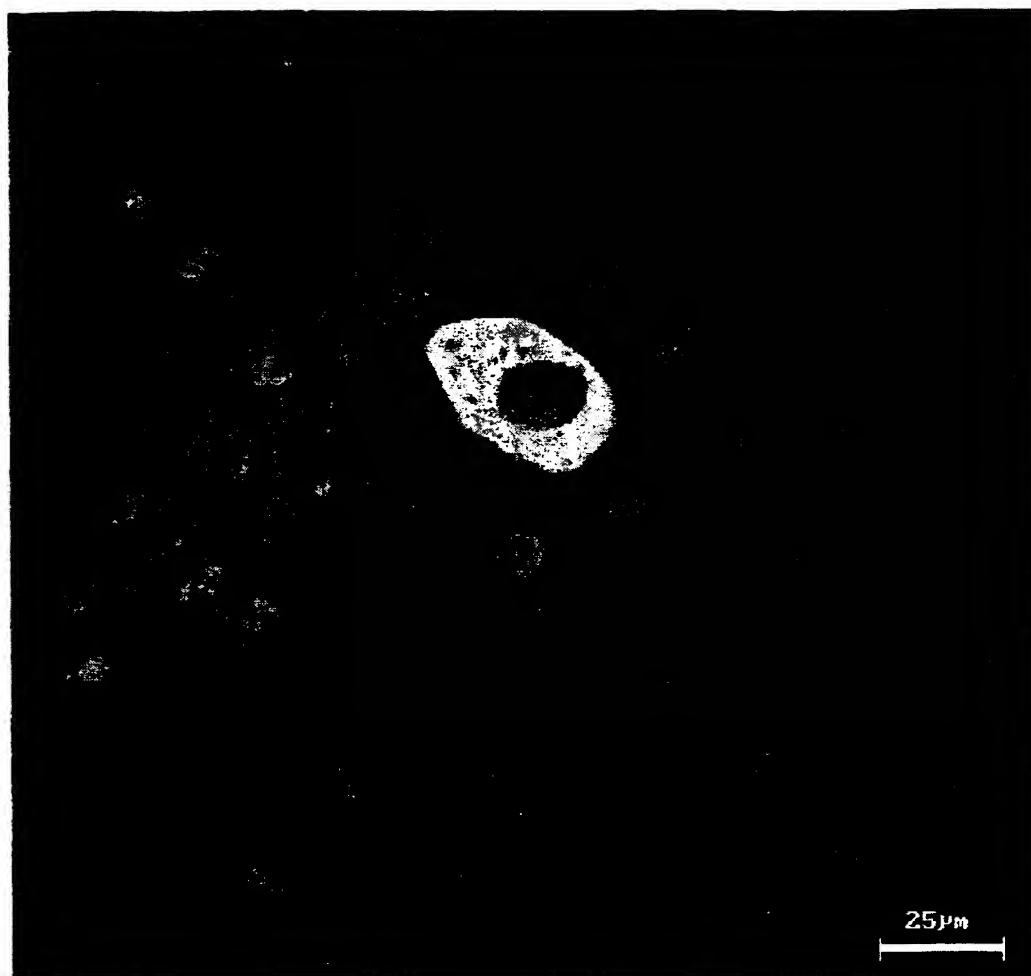






2 / 2

図 2





## SEQUENCE LISTING

<110> MIYATA, Toshio

KUROKAWA, Kiyoshi

<120> Meg-3 protein

<130> KRK-103PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-123561

<151> 1999-04-30

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3768

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS



<222> (53)... (2251)

<400> 1

caggaac1gg gccagctccg gtcccttcc1 tt1gggggc1c1 tcac1c1gga gg atg ggg 58

Met Gly

1

1gg atg gga gaa aaa acc ggg aag atc ctg acg gag ttc ctc cag ttc 106

Trp Met Gly Glu Lys Thr Gly Lys Ile Leu Thr Glu Phe Leu Gln Phe

5

10

15

tat gaa gac cag tat ggc gtg gct ctc ttc aac agc atg cgc cat gag 154

Tyr Glu Asp Gln Tyr Gly Val Ala Leu Phe Asn Ser Met Arg His Glu

20

25

30

att gag ggc acg ggg ctg ccg cag gcc cag ctg ctc tgg cgc aag g1g 202

Ile Glu Gly Thr Gly Leu Pro Gln Ala Gln Leu Leu Trp Arg Lys Val

35

40

45

50

cca ctg gac gag cgc atc gtc ttc tgc ggg aac ctc ttc cag cac cag 250

Pro Leu Asp Glu Arg Ile Val Phe Ser Gly Asn Leu Phe Gln His Gln

55

60

65

gag gac agc aag aag tgg aga aac cgc ttc agc ctc g1g ccc cac aac 298

Glu Asp Ser Lys Lys Trp Arg Asn Arg Phe Ser Leu Val Pro His Asn

70

75

80



tac ggg ctg gtg ctc tac gaa aac aaa gcg gcc tat gag cgg cag gtc 346  
Tyr Gly Leu Val Leu Tyr Glu Asn Lys Ala Ala Tyr Glu Arg Gln Val  
85 90 95

cca cca cga gcc gtc atc aac agt gca ggc tac aaa atc ctc acg tcc 394  
Pro Pro Arg Ala Val Ile Asn Ser Ala Gly Tyr Lys Ile Leu Thr Ser  
100 105 110

gtg gac caa tac ctg gag ctc att ggc aac tcc tta cca ggg acc acg 442  
Val Asp Gln Tyr Leu Glu Leu Ile Gly Asn Ser Leu Pro Gly Thr Thr  
115 120 125 130

gca aag tcg ggc agt gcc ccc atc ctc aag tgc ccc aca cag ttc ccg 490  
Ala Lys Ser Gly Ser Ala Pro Ile Leu Lys Cys Pro Thr Gln Phe Pro  
135 140 145

ctc atc ctc tgg cat cct tat gcg cgt cac tac tac ttc tgc atg atg 538  
Leu Ile Leu Trp His Pro Tyr Ala Arg His Tyr Tyr Phe Cys Met Met  
150 155 160

aca gaa gcc gag cag gac aag tgg cag gct gtg ctg cag gac tgc atc 586  
Thr Glu Ala Glu Gln Asp Lys Trp Gln Ala Val Leu Gln Asp Cys Ile  
165 170 175

cgg cac tgc aac aat gga atc cct gag gac tcc aag gla gag ggc cct 634





Arg His Cys Asn Asn Gly Ile Pro Glu Asp Ser Lys Val Glu Gly Pro

180

185

190

gcg ttc aca gat gcc atc cgc atg tac cga cag tcc aag gag ctg tac 682

Ala Phe Thr Asp Ala Ile Arg Met Tyr Arg Gln Ser Lys Glu Leu Tyr

195

200

205

210

ggc acc tgg gag atg ctg tgt ggg aac gag gtg cag atc ctg agc aac 730

Gly Thr Trp Glu Met Leu Cys Gly Asn Glu Val Gln Ile Leu Ser Asn

215

220

225

ctg gtg atg gag gag ctg ggc cct gag ctg aag gca gag ctg ggc ccg 778

Leu Val Met Glu Glu Leu Gly Pro Glu Leu Lys Ala Glu Leu Gly Pro

230

235

240

cgg ctg aag ggg aaa ccg cag gag cgg cag cgg cag tgg atc cag atc 826

Arg Leu Lys Gly Lys Pro Gln Glu Arg Gln Arg Gln Trp Ile Gln Ile

245

250

255

tcg gac gcc gtg tac cac atg gtg tac gag cag gcc aag gcg cgc ttc 874

Ser Asp Ala Val Tyr His Met Val Tyr Glu Gln Ala Lys Ala Arg Phe

260

265

270

gag gag gtg ctg tcc aag gtg cag cag gtg cag ccg gcc atg cag gcc 922

Glu Glu Val Leu Ser Lys Val Gln Gln Val Gln Pro Ala Met Gln Ala

275

280

285

290



gtc atc cga act gac atg gac caa att atc acc tcc aag gag ctc ctt 970  
Val Ile Arg Thr Asp Met Asp Gln Ile Ile Thr Ser Lys Glu Leu Leu  
295 300 305

gcc agc aag atc cga gcc ttc atc ctc ccc aag gca gag gtg tgc gtg 1018  
Ala Ser Lys Ile Arg Ala Phe Ile Leu Pro Lys Ala Glu Val Cys Val  
310 315 320

cgg aac cat gtc cag ccc tac atc cca tcc atc ctg gag gcc ctg atg 1066  
Arg Asn His Val Gln Pro Tyr Ile Pro Ser Ile Leu Glu Ala Leu Met  
325 330 335

gtc ccc acc agc cag ggc ttc act gag gtg cga gat gtc ttc ttc aag 1114  
Val Pro Thr Ser Gln Gly Phe Thr Glu Val Arg Asp Val Phe Phe Lys  
340 345 350

gag gtc acg gac atg aac ctg aac gtc atc aac gag ggc ggc att gac 1162  
Glu Val Thr Asp Met Asn Leu Asn Val Ile Asn Glu Gly Gly Ile Asp  
355 360 365 370

aag ctg ggc gag tac atg gag aag ctg tcc cgg ctg ggc tac cac ccc 1210  
Lys Leu Gly Glu Tyr Met Glu Lys Leu Ser Arg Leu Ala Tyr His Pro  
375 380 385

ctg aag atg cag agc tgc tat gag aag atg gag tgc ctg cga ctg gac 1258



Leu Lys Met Gln Ser Cys Tyr Glu Lys Met Glu Ser Leu Arg Leu Asp

390

395

400

ggg ctg cag cag cga ttt gat gtg tcc agc acg tcc gtg ttc aag cag 1306

Gly Leu Gln Gln Arg Phe Asp Val Ser Ser Thr Ser Val Phe Lys Gln

405

410

415

cga gcc cag atc cac atg cgg gag caa atg gac aat gcc gtg tat acg 1354

Arg Ala Gln Ile His Met Arg Glu Gln Met Asp Asn Ala Val Tyr Thr

420

425

430

ttc gag acc ctg ctg cac cag gag ctg ggg aag ggg ccc acc aag gag 1402

Phe Glu Thr Leu Leu His Gln Glu Leu Gly Lys Gly Pro Thr Lys Glu

435

440

445

450

gag ctg tgc aag tcc atc cag cgg gtc ctg gag cgg gtg ctg aaa aaa 1450

Glu Leu Cys Lys Ser Ile Gln Arg Val Leu Glu Arg Val Leu Lys Lys

455

460

465

tac gac tac gac agc agc tct gtg cgg aag agg ttc ttc cgg gag gcg 1498

Tyr Asp Tyr Asp Ser Ser Ser Val Arg Lys Arg Phe Phe Arg Glu Ala

470

475

480

ctg ctg cag atc agc atc ccg ttc ctg ctg aag aag ctg gcc cct acc 1546

Leu Leu Gln Ile Ser Ile Pro Phe Leu Leu Lys Lys Leu Ala Pro Thr

485

490

495



igc aag tcg gag ctg ccc cgg ttc cag gag ctg atc ttc gag gac ttt 1594  
Cys Lys Ser Glu Leu Pro Arg Phe Gln Glu Leu Ile Phe Glu Asp Phe  
500 505 510

gcc agg ttc atc ctg gtg gaa aac acg tac gag gag gtg gtg ctg cag 1642  
Ala Arg Phe Ile Leu Val Glu Asn Thr Tyr Glu Glu Val Val Leu Gln  
515 520 525 530

acc gtc atg aag gac atc ctg cag gct gtg aag gag gcc gcg gtg cag 1690  
Thr Val Met Lys Asp Ile Leu Gln Ala Val Lys Glu Ala Ala Val Gln  
535 540 545

agg aag cac aac ctc tac cgg gac agc atg gtc atg cac aac agc gac 1738  
Arg Lys His Asn Leu Tyr Arg Asp Ser Met Val Met His Asn Ser Asp  
550 555 560

ccc aac ctg cac ctg ctg gcc gag ggc gcc ccc atc gac tgg ggc gag 1786  
Pro Asn Leu His Leu Leu Ala Glu Gly Ala Pro Ile Asp Trp Gly Glu  
565 570 575

gag tac agc aac agc ggc ggg ggc ggc agc ccc agc ccc agc acc ccg 1834  
Glu Tyr Ser Asn Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ser Pro Ser Thr Pro  
580 585 590

gag tca gcc acc ctc tcg gaa aag cga cgg cgc gcc aag cag gtg gtc 1882





Glu Ser Ala Thr Leu Ser Glu Lys Arg Arg Arg Ala Lys Gln Val Val

595

600

605

610

tcg gtc gtc cag gat gag gag gtc ggg ctg ccc ttt gag gct agc cct 1930

Ser Val Val Gln Asp Glu Glu Val Gly Leu Pro Phe Glu Ala Ser Pro

615

620

625

gag tca cca cca cct gcg tcc ccg gac ggt gtc act gag atc cga ggc 1978

Glu Ser Pro Pro Pro Ala Ser Pro Asp Gly Val Thr Glu Ile Arg Gly

630

635

640

ctg ctg gcc caa ggt ctg cgg cct gag agc ccc cca cca gcc ggc ccc 2026

Leu Leu Ala Gln Gly Leu Arg Pro Glu Ser Pro Pro Pro Ala Gly Pro

645

650

655

ctg ctg aac ggg gcc ccc gct ggg gag agt ccc cag cct aag gcc gcc 2074

Leu Leu Asn Gly Ala Pro Ala Gly Glu Ser Pro Gln Pro Lys Ala Ala

660

665

670

ccc gag gcc tcc tgg ccg cct gcc tca ccc ctg cag cat ctg ctg cct 2122

Pro Glu Ala Ser Ser Pro Pro Ala Ser Pro Leu Gln His Leu Leu Pro

675

680

685

690

gga aag gct gtc gac ctg ggg ccc ccc aag ccc agc gac cag gag act 2170

Gly Lys Ala Val Asp Leu Gly Pro Pro Lys Pro Ser Asp Gln Glu Thr

695

700

705



gga gag cag gtg tcc agc ccc agc agc cac ccc gcc ctc cac acc acc 2218  
Gly Glu Gln Val Ser Ser Pro Ser Ser His Pro Ala Leu His Thr Thr  
710 715 720

acc gag gac agt gca ggg gtg cag act gag ttc taggccagtg ggccccagc 2271  
Thr Glu Asp Ser Ala Gly Val Gln Thr Glu Phe  
725 730

tgctgcacat ggcacaggcc gtccccctcc ggaccaggc aggcacagc ctggggaggg 2331

cacctgggc tgtgccttgt gggtaggaggc ggggcagggc tgtgtggcac cgccaggag 2391

cgggcccacc tagtcactt tatgggttc agtcaacact ttcttgctcc ctgtttctc 2451

ttctgtggga tgaatcaga tgcaggggc gtgtttgggg ttcttcgtc tgtccaagg 2511

gtggacact gctggggggc tggaaagccc cccccctc gtcccttcgt ggccccaac 2571

ccccatggg tgcgccac cttccaggag agaggagggt gaaagctgg gtgagcccag 2631

tgggttcccc cccatcacc caggagctg ctggcccagg accgggagag ggagcacgc 2691

tggcccttcg gcccgtctc ttccgcagt aggggtggac cgagccctgc ttccccact 2751

gtctggagg gaagggaag gagggggtc tcaggctgga gccaggctgg gggtgtggg 2811



iggagagatg agatlltaggg ggigccical gggglgggca ggcclggggg gaaalgagaa 2871

aggcccagaa cgtgcaggic lgcggagggg aaglgiccig agtgaaggag gggaccccat 2931

cclggggatg clgggagtga gtgagtgaga lggclgagtg agggllatgg ggagccigag 2991

gllllatggg ccigtgtatc cccctccccc ggccccagcc lgcctccccc ctgcccgcct 3051

ggccccacagg tcctccctctg gtcctctccc ccttggttgg lggggaigga gcggcagcaa 3111

ggggtgtaat ggggcctggg tcgtcttct acagggccacc ccgaggicct cagtgttgc 3171

ctggggagcc ggacggggct ccigaggggt acaggttggg lgggcccctc ctgagggtct 3231

ggggtcagcc ttggccctct gctgccctc agtcaccaag tcacctccct ctgaaaaacc 3291

agtccttct ttggaigtc ttgtagtca ccttgggcct ggcgtctgc cctccctcagc 3351

ttcttgctc tgggacaagg gtaagccag galgggccc ggcctgggat ccccccccc 3411

aggacccac aggcctccct ccttgnlgnl ttggggggg caggacagaa atggactcc 3471

ttgggctcc cgaggggg tccccccca gcccgcctc ctccgtccc tagacctgc 3531

ccccagagga ggggccttga cccacaggaa gtagggggg ggcctggcat cagggacccc 3591



cagctgccgc agccctgggt ttggcgcat ctttccctc ttgtcccgaa gatttgcgcc 3651

tttagtgcct tttaggggt tccatcatc cctccctgat attgtatga aaatatatg 3711

cacacgttc atgttttac taatcaataa acgtttatt taaaaaaaaa aaaaaaa 3768

<210> 2

<211> 733

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Trp Met Gly Glu Lys Thr Gly Lys Ile Leu Thr Glu Phe Leu

1

5

10

15

Gln Phe Tyr Glu Asp Gln Tyr Gly Val Ala Leu Phe Asn Ser Met Arg

20

25

30

His Glu Ile Glu Gly Thr Gly Leu Pro Gln Ala Gln Leu Leu Trp Arg

35

40

45

Lys Val Pro Leu Asp Glu Arg Ile Val Phe Ser Gly Asn Leu Phe Gln

50

55

60





His Gln Glu Asp Ser Lys Lys Trp Arg Asn Arg Phe Ser Leu Val Pro

65

70

75

80

His Asn Tyr Gly Leu Val Leu Tyr Glu Asn Lys Ala Ala Tyr Glu Arg

85

90

95

Gln Val Pro Pro Arg Ala Val Ile Asn Ser Ala Gly Tyr Lys Ile Leu

100

105

110

Thr Ser Val Asp Gln Tyr Leu Glu Leu Ile Gly Asn Ser Leu Pro Gly

115

120

125

Thr Thr Ala Lys Ser Gly Ser Ala Pro Ile Leu Lys Cys Pro Thr Gln

130

135

140

Phe Pro Leu Ile Leu Trp His Pro Tyr Ala Arg His Tyr Tyr Phe Cys

145

150

155

160

Met Met Thr Glu Ala Glu Gln Asp Lys Trp Gln Ala Val Leu Gln Asp

165

170

175

Cys Ile Arg His Cys Asn Asn Gly Ile Pro Glu Asp Ser Lys Val Glu

180

185

190

Gly Pro Ala Phe Thr Asp Ala Ile Arg Met Tyr Arg Gln Ser Lys Glu

195

200

205



Leu Tyr Gly Thr Trp Glu Met Leu Cys Gly Asn Glu Val Gln Ile Leu

210

215

220

Ser Asn Leu Val Met Glu Glu Leu Gly Pro Glu Leu Lys Ala Glu Leu

225

230

235

240

Gly Pro Arg Leu Lys Gly Lys Pro Gln Glu Arg Gln Arg Gln Trp Ile

245

250

255

Gln Ile Ser Asp Ala Val Tyr His Met Val Tyr Glu Gln Ala Lys Ala

260

265

270

Arg Phe Glu Glu Val Leu Ser Lys Val Gln Gln Val Gln Pro Ala Met

275

280

285

Gln Ala Val Ile Arg Thr Asp Met Asp Gln Ile Ile Thr Ser Lys Glu

290

295

300

Leu Leu Ala Ser Lys Ile Arg Ala Phe Ile Leu Pro Lys Ala Glu Val

305

310

315

320

Cys Val Arg Asn His Val Gln Pro Tyr Ile Pro Ser Ile Leu Glu Ala

325

330

335

Leu Met Val Pro Thr Ser Gln Gly Phe Thr Glu Val Arg Asp Val Phe



340	345	350
Phe Lys Glu Val Thr Asp Met Asn Leu Asn Val Ile Asn Glu Gly Gly		
355	360	365
Ile Asp Lys Leu Gly Glu Tyr Met Glu Lys Leu Ser Arg Leu Ala Tyr		
370	375	380
His Pro Leu Lys Met Gln Ser Cys Tyr Glu Lys Met Glu Ser Leu Arg		
385	390	395
Leu Asp Gly Leu Gln Gln Arg Phe Asp Val Ser Ser Thr Ser Val Phe		
405	410	415
Lys Gln Arg Ala Gln Ile His Met Arg Glu Gln Met Asp Asn Ala Val		
420	425	430
Tyr Thr Phe Glu Thr Leu Leu His Gln Glu Leu Gly Lys Gly Pro Thr		
435	440	445
Lys Glu Glu Leu Cys Lys Ser Ile Gln Arg Val Leu Glu Arg Val Leu		
450	455	460
Lys Lys Tyr Asp Tyr Asp Ser Ser Ser Val Arg Lys Arg Phe Phe Arg		
465	470	475
480		



Glu Ala Leu Leu Gln Ile Ser Ile Pro Phe Leu Leu Lys Lys Leu Ala

485

490

495

Pro Thr Cys Lys Ser Glu Leu Pro Arg Phe Gln Glu Leu Ile Phe Glu

500

505

510

Asp Phe Ala Arg Phe Ile Leu Val Glu Asn Thr Tyr Glu Glu Val Val

515

520

525

Leu Gln Thr Val Met Lys Asp Ile Leu Gln Ala Val Lys Glu Ala Ala

530

535

540

Val Gln Arg Lys His Asn Leu Tyr Arg Asp Ser Met Val Met His Asn

545

550

555

560

Ser Asp Pro Asn Leu His Leu Leu Ala Glu Gly Ala Pro Ile Asp Trp

565

570

575

Gly Glu Glu Tyr Ser Asn Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Ser Pro Ser

580

585

590

Thr Pro Glu Ser Ala Thr Leu Ser Glu Lys Arg Arg Arg Ala Lys Gln

595

600

605

Val Val Ser Val Val Gln Asp Glu Glu Val Gly Leu Pro Phe Glu Ala

610

615

620





Ser Pro Glu Ser Pro Pro Pro Ala Ser Pro Asp Gly Val Thr Glu Ile

625

630

635

640

Arg Gly Leu Leu Ala Gln Gly Leu Arg Pro Glu Ser Pro Pro Pro Ala

645

650

655

Gly Pro Leu Leu Asn Gly Ala Pro Ala Gly Glu Ser Pro Gln Pro Lys

660

665

670

Ala Ala Pro Glu Ala Ser Ser Pro Pro Ala Ser Pro Leu Gln His Leu

675

680

685

Leu Pro Gly Lys Ala Val Asp Leu Gly Pro Pro Lys Pro Ser Asp Gln

690

695

700

Glu Thr Gly Glu Gln Val Ser Ser Pro Ser Ser His Pro Ala Leu His

705

710

715

720

Thr Thr Thr Glu Asp Ser Ala Gly Val Gln Thr Glu Phe

725

730

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 18



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

tgtaaaacga cggccagt

18

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

accatgatta cgccaagcctt g

21

<210> 5

<211> 30



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Probe Sequence

<400> 5

taccitggagc tcatitggcaa cicccttacca

30

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

cggaattcat ggggtggatg gg

22

<210> 7

<211> 31



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

gcgaattcta gaactcagtc tgcaccccig c

31

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

gcgaattcga actcagtcig caccccigc

29





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02831

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/435, C12N1/15, C12N1/19,  
C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/18,  
G01N33/53, G01N33/50, A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/435, C12N1/15, C12N1/19,  
C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/18,  
G01N33/53, G01N33/50, A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
BIOSYS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YOSHINARI YASUDA, et al., "Functional quantitative analysis of the genome in clustered human mesangial cells", Kidney International(1998), Vol.53, No.1, pp.154-158	1-20
Y	Toshio Miyata, et al., "A Mesangium-predominant Gene, Megsin, Is a New Serpin Upregulated in IgA Nephropathy", J. Clin. Invest. (1998), Vol.102, No.4, pp.828-836	1-20
P, X	WO, 99/33981, A2 (INCYTE PHARMATICALS, INC), 08 July, 1999 (08.07.99), SEQ ID NO:24 (Family: none)	6, 11
A	EP, 780472, A2 (Hsp Research Institute, Inc.), 25 June, 1997 (25.06.97), pp.13-15 SEQ ID NO:2 2945-2959bp & JP, 10-84971, A pp.11-13, arrangement No.:2 2945-2959bp & AU, 7423796, A & CN, 1158896, A	6, 11
P, A	Norio Terada et al., "Zou Chikkan no Bunshi Igaku, Kanzou Byou to Signal Dentatsu", Gengai Iryo,	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
02 August, 2000 (02.08.00)

Date of mailing of the international search report  
15 August, 2000 (15.08.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02831

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	March 2000, Vol.32, No.3, pp.745-750	

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/435, C12N1/15, C12N1/19,  
C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/18,  
G01N33/53, G01N33/50, A01K67/027

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/435, C12N1/15, C12N1/19,  
C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C07K16/18,  
G01N33/53, G01N33/50, A01K67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
BIOSYS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	YOSHINARI YASUDA, et al., "Functional quantitative analysis of the genome in clustered human mesangial cells", Kidney International(1998), Vol.53, No.1, p.154-158	1-20
Y	Toshio Miyata, et al., "A Mesangium-predominant Gene, Megsin, Is a New Serpin Upregulated in IgA Nephropathy", J. Clin. Invest. (1998), Vol.102, No.4, p.828-836	1-20

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.08.00

国際調査報告の発送日

15.08.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

4B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO, 99/33981, A2 (INCYTE PHARMATICALS, INC), 8. 7月. 1999 (08. 07. 99), SEQ ID NO:24 (ファミリーなし)	6, 11
A	EP, 780472, A2 (Hsp Research Institute, Inc.) 25. 6月. 1997 (25. 06. 97), p. 13-15 SEQ ID NO:2 2945-2959bp &JP, 10-84971, A, p. 11-13 配列番号:2 2945-2959bp &AU, 7423796, A & CN, 1158896, A	6, 11
P, A	寺田典生 外著, 「腎疾患の分子医学 腎臓病とシグナル伝達」, 現代医療, 2000年3月, 第32巻, 第3号, p. 745-750	1-20